

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

Carolina Pinhol Vieira

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL A GLICOCORTICOIDE SINTÉTICO NO  
DESENVOLVIMENTO DO TESTÍCULO DE CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2024

Carolina Pinhol Vieira

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL A GLICOCORTICOIDE SINTÉTICO NO  
DESENVOLVIMENTO DO TESTÍCULO DE CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências

Orientadora: Dra. Gleide Fernandes de Avelar

Belo Horizonte

2024

043

Vieira, Carolina Pinhol.

Efeitos da exposição pré-natal a glicocorticoide sintético no desenvolvimento do testículo de camundongos [manuscrito] / Carolina Pinhol Vieira. – 2024.  
93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Gleide Fernandes de Avelar.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Glucocorticoides. 3. Testículo. 4. Espermatogênese. 5. Espermatozoides. 6. Glândulas Suprarrenais. I. Avelar, Gleide Fernandes de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

### ATA DE DEFESA DE TESE DA DISCENTE

**CAROLINA PINHOL VIEIRA**

Às **quatorze horas** do dia **30 de janeiro de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL A GLICOCORTICOIDE SINTÉTICO NO DESENVOLVIMENTO DO TESTÍCULO DE CAMUNDONGOS**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Gleide Fernandes de Avelar**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	Aprovada
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	Aprovada
Dr. Lucas Miranda Kangussu	UFMG	Aprovada
Dr. Ralph Gruppi Thomé	UFSJ	Aprovada
Dra. Marcela Santos Procópio	Centro Avançado de Endometriose	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 30 de janeiro de 2024.**

Dr<sup>a</sup>. Gleide Fernandes de Avelar \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Erika Cristina Jorge \_\_\_\_\_

Dr. Lucas Miranda Kangussu \_\_\_\_\_

Dr. Ralph Gruppi Thomé \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Marcela Santos Procópio\_\_\_\_\_

Documento assinado eletronicamente por **Lucas Miranda Kangussu Gomes Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 31/01/2024, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 31/01/2024, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gleide Fernandes de Avelar, Professora do Magistério Superior**, em 31/01/2024, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ralph Gruppi Thomé, Usuário Externo**, em 01/02/2024, às 14:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcela Santos Procópio, Usuária Externa**, em 06/02/2024, às 07:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3002115** e o código CRC **7E258347**.

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Prof. Dra. Gleide Fernandes de Avelar, e com o auxílio das seguintes instituições:

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

## **AGRADECIMENTOS**

Só tenho a agradecer a todas as pessoas que passaram pelo meu caminho durante esses quatro anos de doutorado e contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, em especial:

À orientadora Gleide Fernandes de Avelar, pela sabedoria, orientação, incentivo, dedicação e competência. Obrigada por confiar em mim, me motivar e me acolher ao longo desses 9 anos trabalhando juntas.

À Nathália, por toda a paciência e disponibilidade em me ajudar e ensinar durante os meus primeiros anos de laboratório. Foi essencial para meu crescimento.

Aos alunos e professores do Laboratório de Biologia Celular, pelo companheirismo, aprendizado e ajuda. Não é possível fazer ciência sozinha e esse apoio é essencial para que todo o trabalho seja possível.

Aos meus pais Célia e Geraldo e irmão Pedro, por sempre estarem do meu lado, me apoiarem, me incentivarem a buscar o melhor e me confortarem quando foi preciso. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao Marcos, pelo companheirismo, amor e pelo colo nos momentos difíceis.

À todos os meus amigos, por todo o apoio de sempre, por ficarem tão felizes com todas minhas conquistas e por todos os momentos de diversão.

Aos camundongos, que cederam a vida em prol da ciência e desenvolvimento.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar e colaborar com essa tese.

À todos os membros do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular.

À CAPES pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Glicocorticoides (GC), no período pré-natal, são responsáveis pela maturação dos pulmões e desenvolvimento de sistemas no feto, sendo rotineiramente utilizados como tratamento para parto prematuro. No entanto, a exposição pré-natal a GC sintéticos pode induzir alterações nos testículos. Sabendo da importância dos glicocorticoides nas funções reprodutivas, nosso objetivo é entender o papel deles na regulação morfofuncional testicular em camundongos neonatos (1 dpc), púberes (35 dpc) e adultos (70 dpc), e nos parâmetros espermáticos, após a exposição à GC exógenos no período pré-natal na dose clínica de 0,4mg/Kg de Dexametasona (DEX 0,4) e na sobredose de 5mg/Kg de Dexametasona (DEX 5) em dose única aos 15,5 dias embrionários, que contempla o período da janela de programação da masculinização do embrião. O grupo controle não sofreu nenhuma manipulação. Foram avaliadas a histomorfometria testicular e da glândula adrenal, a expressão de enzimas esteroidogênicas por RT-PCR e avaliação dos parâmetros espermáticos. Foi demonstrado que nos animais neonatos ocorre uma diminuição no epitélio germinativo no grupo DEX 0,4 comparada a DEX 5 que permaneceu nos animais adultos, apesar de ter tido um aumento em todos os parâmetros analisados nos indivíduos púberes tratados, indicando um avanço na puberdade desses animais. Ainda, foi observado um aumento no índice meiótico e diminuição do índice apoptótico no grupo que recebeu a maior dose de Dexametasona. Em relação ao compartimento intersticial, nos neonatos, houve uma tendência a diminuição dos parâmetros de células de Leydig no grupo DEX 5, enquanto nos animais púberes e adultos houve um aumento do volume nuclear, citoplasmático e celular desse mesmo grupo, provavelmente por serem populações diferentes de células de Leydig, fetal e adulta, que apresentam respostas diferentes aos glicocorticoides no período pré-natal. A glândula adrenal não apresentou diferenças significativas na área e volume, entretanto qualitativamente, apresentaram diferentes efeitos na arquitetura glandular observado nos grupos tratados em relação ao controle. Também não foram observadas diferenças significativas no padrão de expressão dos genes avaliados através de PCR quantitativo. No entanto, a concentração dos espermatozoides aumentou nos grupos DEX 0,4 e DEX 5, assim como houve alterações morfológicas, principalmente, nos defeitos de cabeça e cauda. Além disso, observa-se um aumento na fragmentação do DNA nos camundongos tratados com a maior dose de Dexametasona, indicando que



o aumento na concentração não está relacionado a uma melhor qualidade. Assim, tomados em conjunto, nossos dados indicam que os glicocorticoides têm um forte papel regulatório na função testicular e podem induzir alterações na fertilidade a longo prazo.

**Palavras-chave:** glicocorticoide, testículo, espermatogênese, esteroidogênese, espermatozoide, glândula adrenal

## ABSTRACT

Glucocorticoids, in the prenatal period, promote the maturation of the lungs and the development of systems in the fetus body, with that, they are routinely used as a treatment for preterm labour. However, prenatal exposure to synthetic GC can induce inhibitory responses in the testes. Knowing the importance of glucocorticoids in reproductive functions, our goal is to describe the role of GC in the morphofunctional regulation of the testis in neonatal (1 pnd), pubertal (35 pnd) and adult mice (70 pnd), and sperm parameters, using a clinical dose of 0.4mg/Kg of Dexamethasone (DEX 0.4) and an overdose of 5mg/Kg of Dexamethasone (DEX 5) in a single dose at 15,5 embryonic days, that represents the period of the masculinization programming window. The control group did not undergo any manipulation. Were evaluated the testicular and adrenal gland histomorphometry, the expression of steroidogenic enzymes by RT-PCR and the sperm parameters. It was demonstrated that, in neonatal animals, there is a decrease in the germinal epithelium in DEX 0.4 group compared to DEX 5 and that pattern remained in adult animals, despite the increase in all parameters in the treated puberal individuals, indicating an advance in puberty. Furthermore, an increase in the meiotic index and a decrease in the apoptotic index were observed in the group that received the highest dose of Dexamethasone. Regarding the interstitial compartment, in neonates there was a tendency towards a decrease in Leydig cell parameters in DEX 5 group, while in puberal and adult animals there was an increase in the nuclear, cytoplasmic, and cellular volume of this same group. Probably, fetal and adult Leydig cells present different responses to glucocorticoids in the prenatal period. The adrenal gland did not show significant differences in area and volume, however, qualitatively, they presented different effects on the glandular architecture from the treated groups compared to the control. Also, no significant differences were observed in the expression of the genes evaluated through RT-PCR. However, the levels of INSL3 were repressed in DEX0,4 while unexpressed in DEX5. However, sperm concentration increased in DEX 0,4 and DEX 5 groups, as well as morphological changes, mainly in head and tail defects. Furthermore, an increase in DNA fragmentation was observed in mice treated with the highest dose of Dexamethasone, indicating that the increase in concentration is not related to better quality. Thus, taken together, our data indicate that glucocorticoids

have a strong regulatory role in testicular function and can induce changes in long-term fertility.

**Key-words:** glucocorticoid, testis, spermatogenesis, steroidogenesis, spermatozoa, adrenal gland

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia do testículo.....	41
Figura 2: Volume líquido dos componentes do testículo de animais neonatos (1dpc).....	44
Figura 3: Volume líquido dos componentes do testículo de animais púberes (35dpc).....	47
Figura 4: Volume líquido dos componentes do testículo de animais adultos (70dpc).....	48
Figura 5: Parâmetros de células de Leydig em neonatos (1 dpc).....	48
Figura 6: Parâmetros de células de Leydig em púberes (35 dpc).....	49
Figura 7: Parâmetros de células de Leydig em adultos (70 dpc).....	50
Figura 8: Razões de células germinativas em adultos (70 dpc).....	51
Figura 9: Morfometria da glândula adrenal nos camundongos púberes de 35 dias.....	53
Figura 10: Morfometria da glândula adrenal nos camundongos adultos de 70 dias.....	53
Figura 11: RT-PCR em camundongos adultos.....	55
Figura 12: Análises espermáticas.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na RT-PCR.....	38
Tabela 2. Dados biométricos (média ± SEM) em camundongos neonatos (1 dia), púberes (35 dias) e adultos (70 dias) expostos às diferentes doses de glicocorticoides e grupo controle.....	40
Tabela 3. Dados morfométricos (média ± SEM) do compartimento cordonal do testículo de camundongos com 1 dia expostos a diferentes doses de glicocorticoides e grupos controle.....	43
Tabela 4. Dados morfométricos (média ± SEM) do compartimento cordonal do testículo de camundongos com 35 dias expostos a diferentes doses de glicocorticoides e grupos controle.....	43
Tabela 5. Dados morfométricos (média ± SEM) do compartimento cordonal do testículo de camundongos com 70 dias expostos a diferentes doses de glicocorticoides e grupos controle.....	45
Tabela 6. Dados morfométricos (média ± SEM) do compartimento intercordonal do testículo de camundongos com 1, 35 e 70 dias expostos a diferentes doses de glicocorticoides e grupos controle.....	45
Tabela 7. Integridade de membrana, espermatozoides móveis progressivos e não progressivos, e porcentagem de animais apresentando algum grau de aglutinação (média ± SEM).....	55
Tabela 8. Morfologia dos espermatozoides (média ± SEM) em camundongos adultos (70 dias) expostos a diferentes doses de glicocorticoides e grupos controle.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 17 $\beta$ HSD = 17 beta hidroxisteroide desidrogenase
- 3 $\beta$ HSD = 3 beta hidroxisteroide desidrogenase
- ACTH = hormônio adrenocorticotrópico
- AGP = primórdio adrenogonadal
- ALC = célula de Leydig adulta
- AMH = hormônio anti-mulleriano
- AR = receptor de andrógeno
- BMP2 = proteína óssea morfogenética 2
- BMP7 = proteína óssea morfogenética 7
- cAMP = monofosfato cíclico de adenosina
- CES = ciclo do epitélio seminífero
- DEX 0,4 = 0,4 mg/Kg de Dexametasona
- DEX 5 = 5 mg/Kg de Dexametasona
- DHEA = desidroepiandrosterona
- DHH = *Desert hedgehog*
- DHT = diidrotestosterona
- DMRT1 = fator de transcrição 1 relacionado ao doublesex e mab-3
- Dpn = dias pós-natal
- ER $\alpha$  = receptor nuclear de estrógeno alfa
- ER $\beta$  = receptor nuclear de estrógeno beta
- FLC = célula de Leydig fetal
- FSH = hormônio folículo estimulante
- GAPDH = proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GC = glicocorticoides
- GCs = glicocorticoide sintético
- GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina
- HPA = Hipotálamo – Hipófise – Adrenal
- HPG = Hipotálamo – Hipófise – Gônada

IGF-1 = fator de crescimento semelhante à insulina

IL1 = interleucina 1

INSL3 = peptídeo semelhante à insulina 3

LC = célula de Sertoli

LH = hormônio luteinizante

MR = mineralocorticoides

PDGF $\alpha$  / PDGF-A = fator de crescimento derivado de plaquetas

PED = produção espermática diária

PGCs = células germinativas primordiais

RT-PCR = reação de cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SC = célula de Leydig

SITE = complexo multiproteico Steroidogenic InteracTomE

StAR = proteína reguladora aguda da esteroidogênese

T3 = triiodotironina

T4 = tiroxina

TGF-  $\alpha/\beta$  = fator de crescimento e transformação alfa/beta

TNF $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 Estrutura e desenvolvimento do testículo.....	16
1.2 Células de Sertoli.....	18
1.3 Células de Leydig e regulação hormonal do testículo.....	20
1.4 Espermatogênese e maturação espermática.....	23
1.5 Glândula adrenal e glicocorticoides.....	26
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Animais e tratamento com glicocorticoide.....	31
3.2 Coleta dos tecidos e processamento.....	31
3.3 Avaliação histomorfométrica.....	32
3.3.1 Testículos.....	32
a) Proporção volumétrica e volume líquido dos componentes testiculares.....	32
b) Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero.....	32
c) Comprimento dos túbulos seminíferos.....	32
d) Diâmetro nuclear das células de Sertoli e Leydig, e proporção núcleo/citoplasma.....	33
e) Núcleo das células de Leydig e Sertoli, capacidade de suporte das SC.....	34
f) Contagem do número de células germinativas e de Sertoli no estágio VII do CES, e razões entre números celulares obtidos para os animais com 70 dias.....	34
g) Produção espermática diária.....	36
3.3.2 Glândula adrenal.....	36
3.4 Transcrição reversa – Reação da cadeia de polimerase (RT-PCR).....	37
3.5 Avaliação espermática.....	38



3.6	Fragmentação do DNA.....	39
3.7	Análises estatísticas.....	39
4.	RESULTADOS.....	40
4.1	Biometria.....	40
4.2	Histomorfometria testicular.....	41
4.2.1	Compartimento cordonal/tubular.....	42
4.2.2	Compartimento intersticial.....	45
4.2.3	Células germinativas e produção espermática diária.....	50
4.3	Histomorfometria da glândula adrenal.....	52
4.4	RT – PCR.....	54
4.5	Avaliação espermática.....	55
5.	DISCUSSÃO.....	58
6.	CONCLUSÃO.....	64
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8.	ANEXOS.....	75
8.1	Artigos publicados em colaboração.....	75
8.2	Artigo publicado como primeira autora.....	78

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Estrutura e desenvolvimento do testículo

O testículo dos mamíferos é um órgão ovoide que possui duas funções principais: produzir o hormônio andrógênio testosterona, responsável pela manutenção de características masculinas, e produzir o gameta masculino haploide, o espermatozoide, que auxilia na manutenção da espécie e perpetuação de características genéticas paternas (França & Russell, 1998; Holstein, 2003). A gônada está localizada no escroto, uma bolsa músculo-cutânea que se encontra no exterior do abdome para manter a sua temperatura cerca de 2 a 4°C abaixo da temperatura corporal e otimizar a produção de espermatozoides viáveis (Waites, 1991; Setchell, 1998). Esse órgão é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, chamada túnica albugínea, que emite septos, dividindo o parênquima testicular em lóbulos (Holstein, 2003). Os lóbulos testiculares podem ser morfofuncionalmente divididos em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, onde se encontram células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, células dendríticas, fibroblastos, macrófagos, mastócitos e outras células do tecido conjuntivo (Russel et al., 1990); e o compartimento dos túbulos seminíferos ou tubular, que constitui cerca de 70 a 90% do parênquima testicular, são formados por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular (França & Russell, 1998, França & Chiarini-Garcia., 2005). A túnica própria reveste o túbulo seminífero externamente, e é composta de matriz extracelular, como colágeno e laminina, e células peritubulares mioídes que auxiliam na movimentação do fluido tubular e propulsão dos espermatozoides através dos túbulos. O epitélio seminífero é altamente organizado por células germinativas em diferentes estágios de diferenciação, suportadas estruturalmente por células de Sertoli, que secretam um fluido sob influência de andrógenos formando o lúmen tubular, que consiste na região central dos túbulos (Russel et al, 1990; Lara et al, 2018a). Este fluido é coletado pela rete testis e levado ao epidídimo, ele possui substâncias importantes para a função epididimária e é responsável por carrear os espermatozoides ainda imóveis através dos ductos eferentes até esse órgão, para sofrerem maturação, adquirirem motilidade e serem armazenados até sua liberação (Russell et al., 1990; Sullivan et al., 2007).

O desenvolvimento do testículo se inicia no período embrionário, quando o mesonéfron emite duas cristas urogenitais na cavidade do epitélio celômico que

sofrem um espessamento para formar o órgão bipotencial, um órgão par bilateral composto por células somáticas e esteroidogênicas originadas por proliferação de células do epitélio celomático (Lin & Capel, 2015). As células germinativas primordiais (PGCs) que surgiram na base do alantoide com 7,5 dias embrionários (e7,5) em camundongos, migram pelo mesentério dorsal para as cristas genitais aos e10,5 e o órgão bipotencial começa a se diferenciar em testículo após a expressão do gene Sry, que desencadeia a cascata de genes envolvidos na determinação sexual (Lin & Capel, 2015; Peric et al, 2023). O desenvolvimento da gônada masculina depende da atividade que ocorre durante a janela de programação da masculinização (masculinization programming window), e é um processo hormônio-dependente, regulado por três hormônios principais: AMH (hormônio anti-mulleriano), INSL3 (peptídeo semelhante à insulina 3) e testosterona, que induzem o desenvolvimento das células somáticas em células de Sertoli, das células esteroidogênicas em células de Leydig e das PGCs em espermatogônias (Rey et al., 2013; Svechnikov et al 2014; Sharpe, 2020). Esse processo ocorre entre e15,5 - e18,5 em ratos, e14,5 - e16,5 em camundongos e 8 a 14 semanas de gestação em humanos (Welsh et al., 2008; Sharpe et al., 2020). A formação dos cordões seminíferos, o descenso testicular e desenvolvimento da genitália externa, assim como a supressão ativa de genes e estruturas femininas como ducto Mulleriano que daria origem a tuba uterina, útero e vagina, também ocorrem nesse período e são essenciais para o correto desenvolvimento das características fenotípicas masculinas (Lin & Capel, 2015; Huang et al, 2017; Mäkelä et al, 2019)

O desenvolvimento pós-natal do testículo, na maioria dos mamíferos, pode ser dividido em duas fases (França et al., 2000). A primeira fase tem duração de aproximadamente duas a três semanas após o nascimento, em ratos e camundongos, e é caracterizada por intensa proliferação de espermatogônias e células de Sertoli, promovendo crescimento em comprimento dos cordões testiculares; na segunda fase, que ocorre de quinze dias a várias semanas após o nascimento, observa-se acentuado aumento no número de células germinativas com início da sua diferenciação e aumento na população de células de Leydig adultas, essas mudanças geram um evidente crescimento no tamanho do testículo e do diâmetro tubular, bem como a secreção de fluido pelas células de Sertoli (França et al., 2000; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001). Essas fases são reguladas por hormônios e fatores

de crescimento específicos, como por exemplo, o FSH, os andrógenos e os hormônios tireoidianos, considerados os principais reguladores da proliferação, diferenciação e maturação das células de Sertoli, e pela expressão de genes responsáveis pela manutenção da determinação sexual (Cooke et al., 2004; Huang et al., 2017; Sharpe, 2020). Em camundongos, a puberdade se instala com cerca de 35 dias após o nascimento, caracterizada pela maturação das células somáticas, estabelecimento da espermatogênese para atingir a maturidade sexual e reativação da via Hipotálamo - Hipófise - Gônada (HPG) estimulando a esteroidogênese nas células de Leydig (Castellano & Tena-Sempere, 2016). Esses processos vão ser melhor descritos nos tópicos subsequentes.

## **1.2 Células de Sertoli**

As células de Sertoli (SC) foram descritas inicialmente por Enrico Sertoli em 1865 como células grandes e irregulares ligadas à produção de espermatozoides. São o maior tipo celular presente no testículo, podendo ocupar de 10 a 40% do volume do epitélio seminífero, dependendo da espécie e apresentam um núcleo com nucléolo, e citoplasma ocupado, predominantemente, por retículo endoplasmático liso, lisossomos e mitocôndrias (Fawcett, 1994). As células de Sertoli, com sua forma assimétrica e prismática, conectam suas extensões citoplasmáticas às outras SC adjacentes através de complexos juncionais de oclusão especializados (O'Donnell et al., 2000; Holstein, 2003), que constitui a base morfológica da barreira hemato-testicular, criando um ambiente imunoprivilegiado para proteger o gameta masculino, impedindo a passagem de substâncias estranhas e antígenos para o interior do túbulo seminífero. A barreira cria dois compartimentos: o basal, onde situam-se as espermatogônias e os espermátócitos primários iniciais, e o adluminal, que abriga as demais células da linhagem germinativa em estágios mais avançados e os espermatozoides (França et al, 2012; Lara et al, 2018b).

Além da proteção imune, a barreira hemato-testicular fornece comunicação entre células de Sertoli adjacentes, controla o trânsito de moléculas do sangue e interstício para o túbulo seminífero, e o fluido existente no compartimento adluminal é produto da secreção das SC (Lara et al, 2018a/b). Além disso, essas células desempenham outras funções essenciais para a espermatogênese: fornecem nutrientes, suporte

estrutural e metabólico para as células germinativas, participam do processo de liberação das espermátides para o lúmen tubular, fagocitam e digerem o citoplasma residual resultante da diferenciação das espermátides e as células germinativas que sofrem apoptose. Essa intensa atividade digestiva é traduzida pelo grande número de lisossomos presentes no seu citoplasma. A célula de Sertoli também tem papel na maturação das células germinativas, pela produção de proteínas específicas, e na intermediação hormonal da espermatogênese devido a presença de receptores para FSH, andrógenos e hormônios tireoidianos, por exemplo (França & Russell, 1998; Schulz et al., 2010). Essas células conseguem realizar diversas funções simultaneamente devido à sua extensão e capacidade de alterar sua morfologia ao longo do ciclo do epitélio seminífero com translocação de organelas, expressão de diferentes proteínas e alterações na localização desses fatores para atender às diferentes necessidades (Lara et al, 2018a).

A célula de Sertoli é a primeira célula a sofrer diferenciação na gônada primitiva e expressa, no braço curto do cromossomo Y, o gene Sry, que é responsável pela determinação do sexo masculino através da ativação de Sox9, que desencadeia a cascata de genes específicos do fenótipo testicular e repressão de genes envolvidos no desenvolvimento ovariano pela expressão de DMRT1 (Capel, 2000; She & Yang, 2017; Huang et al., 2017). Nos mamíferos, a proliferação das SC é mais ativa durante a fase fetal, após a diferenciação sexual, tendo um pico de proliferação antes do nascimento. Após o nascimento, o número de células se expande devido a divisão celular e a proliferação diminui de forma constante até cerca de 2 semanas em camundongos e ratos (Orth, 1982).

A variação dos níveis de FSH parece ser um dos principais fatores responsável pela regulação dessa proliferação e do conseqüente crescimento testicular. Além disso, estudos com andrógenos nos testículos fetais têm mostrado que eles também são importantes reguladores da proliferação destas células somáticas durante a vida fetal e pós-natal (Atanassova et al., 2005; Scott et al., 2008; França et al., 2012). Outros fatores também podem estar envolvidos no processo, como estrógenos, activina, TFG- $\beta$ , BMP2, BMP7, IL1 e TNF $\alpha$  (Lara et al, 2018a). A regulação da via androgênica ocorre de forma indireta, uma vez que as células de Sertoli não expressam receptores de andrógenos durante a fase fetal e perinatal (Sharpe et al., 2020). Ainda, os hormônios tireoidianos, a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3), são responsáveis pela

diferenciação e maturação das células de Sertoli, exercendo papel muito importante para a função testicular durante o período de desenvolvimento pós-natal dos testículos (França et al., 1995; Cooke, 2004).

A formação das SC é um evento chave durante o desenvolvimento testicular, já que elas orquestram a diferenciação de todos os outros tipos celulares (Mäkelä et al., 2019). O aumento dessa população propicia maior disponibilidade de nichos espermatogoniais e para a proliferação de células germinativas, tendo em vista que cada célula de Sertoli é capaz de suportar um número específico de células espermatogênicas (França et al., 1995; França & Russell, 1998). Portanto, o tamanho do testículo e a magnitude da produção espermática do indivíduo são determinados pelo número de células de Sertoli estabelecido durante o período que antecede a puberdade (França & Russell, 1998; Hess & França, 2007).

### **1.3 Células de Leydig e regulação hormonal do testículo**

As células de Leydig (LC) foram descritas em 1850 por Franz Leydig, no entanto, ainda hoje seus mecanismos e origem não estão totalmente elucidados. Há duas populações distintas: a célula de Leydig fetal, importante no período de programação da masculinização; e a célula de Leydig adulta, com importante função esteroidogênica que regula a fase reprodutiva (Chen et al., 2009; Verhoeven et al., 2010; Svingen & Koopman 2013; O'Donnell et al., 2017). Não há um consenso na literatura quanto a origem dessas células, a população fetal se diferencia no testículo por volta de e12,5 e podem ser originadas a partir de células progenitoras somáticas que se diferenciam em células esteroidogênicas na presença de DHH (Desert hedgehog) e PDGF $\alpha$  (fator de crescimento derivado de plaquetas), e de células progenitoras intersticiais provenientes do mesonéfron que populam o testículo no período embrionário (Svechnikov et al., 2010; Rotgers et al., 2018). O principal andrógeno produzido pela população fetal é androstenediona, portanto, nessa fase, as células de Sertoli imaturas têm um papel importante no processo de diferenciação das LC estimulando a esteroidogênese e produzindo a enzima 17 $\beta$ HSD, que converte androstenediona em testosterona (Shima et al., 2013; Hazra et al., 2013; Wen et al., 2016a; Shima & Morohashi, 2017). As células de Leydig fetais, também produzem INSL3, que é essencial para a masculinização e para o descenso testicular (McKinnell

et al., 2005; Potter et al., 2016). Após o nascimento, essas células sofrem apoptose e desaparecem gradualmente, mas há estudos que confirmam que há uma subpopulação de células de Leydig fetais que persistem no testículo de camundongos adultos e não são totalmente substituídas, representando cerca de 10 a 20% das LC. Elas alteram sua expressão gênica para se assemelhar às células de Leydig adultas como uma resposta às mudanças endócrinas após o nascimento, e atuam como células andrógeno-independentes, no entanto, sua função ainda não é bem esclarecida (Kerr & Knell, 1988; Ariyaratne & Mendis-Handagama, 2000; Shima et al., 2015; Wen et al., 2016a,b; Miyabayashi et al., 2017).

A população de células de Leydig adultas também parecem ser originadas de células progenitoras somáticas do epitélio celômico, que são reguladas negativamente pela secreção de AMH por células de Sertoli (Rebourcet et al., 2014, 2017; Rotgers et al., 2018; Bhattacharya & Dey, 2023). Outros autores sugerem outras origens como células perivasculares mesenquimais e células peritubulares mioides (Shima & Morohashi, 2017; Kumar & DeFalco, 2018). No entanto, em 2018, Shima e colaboradores demonstraram que as LC fetais têm o potencial de se desdiferenciar na fase fetal para posteriormente formar populações de células de Leydig adultas, de células peritubulares mioides e de pericitos. Ainda, as células peritubulares mioides e os pericitos, no testículo pós-natal, podem se rediferenciar em células de Leydig adultas, servindo como potenciais células tronco desse tipo celular (Shima et al., 2018; Guan et al., 2019). As LC fetais provenientes de células progenitoras intersticiais do mesonéfron não contribuem com a população de células de Leydig adultas (Rotgers et al., 2018).

As LC adultas passam por três importantes fases: progenitoras, imaturas e adultas. Essas fases são diferenciadas pela sua posição no compartimento intertubular, e pela presença de enzimas esteroideogênicas e de marcadores específicos (Chen et al., 2009; DeFalco et al., 2011; Potter et al., 2016; Ye et al., 2017). Além da presença de hormônios envolvidos na regulação do desenvolvimento e diferenciação dessas células, tais como LH, FSH, estrógenos, andrógenos e hormônios tireoidianos, diversos fatores de crescimento e proteínas também estão envolvidas no processo, como Dhh (Desert hedgehog), PDGF-A (fator de crescimento derivado de plaqueta), TGF- $\alpha/\beta$  (fator de crescimento e transformação), IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) e fatores secretados por macrófagos (Mendis-Handagama &

Ariyaratne, 2001; O'Shaughnessy et al., 2002; De Gendt et al., 2005; Griswold & Behringer 2009; Rijntjes et al., 2009; O'Hara et al., 2015; Ye et al., 2017). As progenitoras das células de Leydig adultas permanecem quiescentes na gônada fetal, são recrutadas após o nascimento, mas só aparecem de forma madura e diferenciada no período pré-púbere com total capacidade esteroidogênica para apoiar a produção espermática (Wen et al, 2016; Rotgers et al., 2018; Bhattacharya & Dey, 2023).

A testosterona é o principal hormônio andrógeno produzido pela célula de Leydig, cuja síntese é regulada pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada (HPG), em que o hipotálamo secreta hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que estimula a hipófise a liberar o hormônio luteinizante (LH), agindo no receptor de LH na membrana da célula de Leydig, que estimula a produção de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e inicia a cascata de síntese da testosterona a partir do colesterol (Clavijo & Hsiao, 2018; Garza, 2023). O colesterol é translocado para a mitocôndria pelo complexo multiproteico SITE (Steroidogenic InteracTomE), composto por proteínas citosólicas e mitocondriais, incluindo a proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), cuja produção é induzida pela ativação de cAMP (Liu et al., 2006; Manna et al., 2009; Papadopoulos, 2021). A via esteroidogênica se inicia, na mitocôndria, com a conversão do colesterol em pregnenolona, pelo citocromo p450<sub>scc</sub> (Cyp11a1) também presente no complexo SITE (Garza, 2023). A pregnenolona, por sua vez, é transportada ao retículo endoplasmático liso, onde ocorrem sucessivas reações através da ação das enzimas 3 $\beta$ HSD e p450<sub>c17</sub> (Cyp17a1) para que seja formada progesterona e androstenediona, que posteriormente é convertida em testosterona pela enzima 17 $\beta$ HSD (Ye et al., 2017; Lawrence et al., 2022). Uma vez sintetizada, a testosterona pode atuar no próprio testículo ou ser liberada na corrente sanguínea transportada por proteína ligadora de andrógeno (ABP) e convertida em diidrotestosterona (DHT) no tecido alvo. Essa conversão é feita pela enzima 5 $\alpha$ redutase, já que a DHT tem maior afinidade pelo receptor de andrógenos (AR) nos tecidos não reprodutivos do que a testosterona (Wei et al., 2020; Lawrence et al., 2022). A testosterona e a androstenediona são substratos para produção de estrógenos pela célula de Leydig, através da ação da enzima Aromatase (p450<sub>arom</sub>), que também parece estar presente em células germinativas e em células de Sertoli. Esses estrógenos agem em receptores nucleares alfa (ER $\alpha$ ) ou beta (ER $\beta$ ) das



diversas células testiculares, e desempenham importantes funções no testículo (Joseph et al., 2011; Carreau et al., 2012; Schulster et al., 2016).

Outros estudos já demonstraram que a produção da testosterona é mantida mesmo na ausência da enzima  $17\beta$ HSD, o que sugere diferentes vias de síntese de andrógenos (Rebourcet et al., 2020; Sipila et al., 2020; Lawrence et al., 2022). A glândula adrenal foi considerada como uma fonte alternativa de produção de hormônios andrógenos, por sintetizar androstenediona, no entanto, ela tem baixa afinidade por AR e não há indícios de conversão em testosterona ou DHT nesse órgão em camundongos ou humanos (Sipila et al., 2020). Tecidos periféricos como próstata, epidídimo e tecido adiposo produzem a enzima  $17\beta$ HSD5 que é capaz de converter androstenediona em testosterona, constituindo uma possível via alternativa na produção desse hormônio (Sipila et al., 2020; Lawrence et al., 2022). Além disso, também pode ser considerada a via conhecida como “Backdoor”, em que DHT é sintetizado a partir de precursores de andrógenos sem precisar da testosterona e já foi identificada em camundongos e humanos (Mahendroo et al., 2004; Shaw et al., 2006; Dhayat et al., 2017). Por fim, a família de  $17\beta$ HSD tem inúmeros subtipos, que possivelmente apresentam mecanismos compensatórios na falta de  $17\beta$ HSD3 no testículo ou outros problemas na produção de testosterona (Lawrence et al., 2022).

#### **1.4 Espermatogênese e maturação espermática**

No período embrionário, a gônada primitiva é ocupada por PGCs que, após a formação dos cordões testiculares entre e12,5 e e14, passam a se chamar gonócitos, e se diferenciam de forma assíncrona em um processo chamado de prespermatogênese por alguns autores, até entrarem em quiescência com cerca de 18,5 dias embrionários (McCarrey, 2013; Mäkelä et al., 2019). Logo antes do nascimento até os primeiros dias pós-natal, os gonócitos retomam sua proliferação e se diferenciam em espermatogônia adquirindo marcadores moleculares característicos, mudanças drásticas na sua morfologia, contato físico com a lâmina basal e reativação da mitose (Pui & Saga, 2017). O desenvolvimento pré-púbere do testículo é caracterizado pela auto-renovação de espermatogônias tronco, suportado pela proliferação das SC, para preparar o testículo para a futura espermatogênese (Mäkelä et al., 2019).

A espermatogênese é um processo cíclico, complexo e bem organizado orquestrado pelas células de Sertoli, que ocorre no interior dos túbulos seminíferos e dura cerca de 30 a 75 dias na maioria dos mamíferos, sendo cerca de 40 dias em camundongos (França & Russell, 1998; França et al., 2005). Este processo consiste na diferenciação de uma espermatogônia diploide em uma célula haploide altamente especializada, o espermatozoide. Neste contexto, a espermatogênese, pode ser dividida em três fases de acordo com suas características morfológicas e funcionais: fase proliferativa ou espermatogonial, fase meiótica ou espermatocitária, e fase de diferenciação ou espermiogênica (Russel et al., 1990; Hess & França, 2007).

A primeira fase da espermatogênese ocorre no compartimento basal e é caracterizada por sucessivas divisões mitóticas das espermatogônias com dois destinos: sua auto-renovação, originando espermatogônias tronco As, Apr ou Aal que vão permitir a contínua produção espermática em mamíferos; ou a diferenciação, gerando espermatogônias diferenciadas comprometidas com o processo espermatogênico, são elas do tipo A1-4, Intermediária (In) e tipo B, que se divide gerando dois espermatócitos primários, representando o início da fase meiótica. Na segunda fase da espermatogênese, os espermatócitos pré-leptótenos são os primeiros a serem formados, com intensa duplicação e recombinação do DNA, seguidos por espermatócitos leptótenos, em que há condensação dos cromossomos e trânsito pela barreira hemato-testicular entrando no compartimento adluminal. A segregação dos cromossomos homólogos acontece nos espermatócitos em zigóteno e paquíteno, além da troca de material genético (crossing over) que finaliza em diplóteno. Esse processo envolve duas divisões meióticas, uma reducional e outra equacional, que acontece muito rapidamente formando as espermátides arredondadas haploides. Na fase espermiogênica, as espermátides arredondadas passam por diversas alterações morfológicas e funcionais para originar os espermatozoides: formação de novas organelas, formação do acrossoma através do complexo de Golgi, formação do flagelo, condensação do DNA, alongamento e eliminação do citoplasma residual, para enfim, ser liberada do epitélio seminífero para o lúmen tubular (Russel, et al., 1990; De Rooij & Russell, 2000; Hess & França, 2007; Lara et al., 2018; Endo et al, 2019; Yoshida, 2020). A estrutura do espermatozoide é caracterizada por cabeça, peça intermediária e cauda. A cabeça contém metade do material genético paterno e o acrossoma, especializado em penetrar a zona pelúcida do oócito. E a peça

intermediária contém mitocôndrias que fornecem energia para a motilidade da cauda, que será adquirida no epidídimo como será explicado à frente.

Todo esse processo é altamente dependente de testosterona para iniciar e manter a diferenciação das células até a espermiogênese, além disso, ácido retinóico tem um importante papel nas divisões mitóticas da primeira fase da espermatogênese, e os hormônios folículo estimulante (FSH) e estrogênio participam das modificações morfoestruturais das células para formação de espermatozoides (Hess & França, 2007; Lara et al., 2018; Endo et al., 2019). Ainda, ocorre uma complexa interação entre as células de Sertoli e células germinativas, que são distribuídas em associações celulares definidas como estágios que se sucedem de maneira ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero (CES) (Russell et al., 1990). Em camundongos, são XII estágios bem definidos e a espermição acontece no estágio VII. A duração do CES é uma constante biológica espécie-específica, que está sobre o controle do genótipo da célula germinativa (Russell et al., 1990; França et al., 1998; Menezes, 2006).

Os espermatozoides produzidos nos testículos são liberados no lúmen, recolhidos pela rete testis, percorrem os ductos eferentes até chegarem ao epidídimo. Eles não são funcionais, e, por isso passam por um processo de maturação epididimária que envolve mudanças morfológicas e bioquímicas para permitir que eles adquiram motilidade e habilidade de fertilizar o ovócito (Robaire, 1988; Hinton & Setchell, 1993). O epidídimo é dividido em três regiões que realizam funções diferentes: cabeça, corpo e cauda. Nos camundongos, a região proximal do epidídimo é chamada de segmento inicial, devido às suas características morfológicas distintas, e está relacionado a absorção de fluidos (Cooper, 1997; Sullivan et al., 2005). A maturação ocorre através de interações dos espermatozoides com o microambiente epididimário, que sofre alterações na sua composição em regiões específicas do ducto epididimário, como mudanças de osmolaridade, da proporção iônica, das reservas energéticas e tipos proteicos. Essas interações modificam a membrana plasmática dos espermatozoides em relação à sua composição, aumentando ligações dissulfídicas e formando associações entre proteínas, algumas delas andrógeno-dependentes (Zenick et al., 1994; Dacheux et al., 2005; Cornwall, 2009). A cabeça do epidídimo é a região mais ativa metabolicamente, onde ocorre 70-80% da secreção proteica (Koch et al., 2015). No corpo e na cauda do epidídimo ocorre a remoção da gota citoplasmática dos espermatozoides e a eliminação de espécies reativas de oxigênio devido a expressão

de enzimas da família da glutathiona peroxidase, além do transporte de água e eletrólitos (Vernet et al., 2004; Leung et al., 2004; Hermo et al., 2005; Cheung et al., 2005). A aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de reconhecimento do ovócito ocorre na cabeça e corpo, enquanto a cauda é principalmente responsável pelo armazenamento e remoção dos espermatozoides anormais (Robaire & Hermo, 1988; Serre & Robaire, 1998). Defeitos nas estruturas dos espermatozoides podem levar à infertilidade, visto que alterações na peça intermediária e cauda prejudicam a motilidade e alterações na cabeça prejudicam a interação entre espermatozoide e oócito (Shen et al., 2019)

### **1.5 Glândula adrenal e glicocorticoides**

A glândula adrenal é um órgão bilateral localizado no polo superior dos rins e consiste em córtex, que sintetiza hormônios esteroides com importantes funções metabólicas, e medula, que produz adrenalina e noradrenalina como parte do Sistema Nervoso Simpático. O córtex de um indivíduo adulto é dividido em três zonas: glomerulosa, fasciculada e reticular (Yates et al., 2013; Kim & Choi, 2020). No período embrionário, o córtex da adrenal se origina do mesoderma e é inicialmente parte da crista urogenital, chamado de primórdio adrenogonadal (AGP). À medida que o embrião se desenvolve, células precursoras do mesonéfron migram dorsomedialmente para estabelecer o córtex da adrenal primordial na região cranial ao mesonéfron, e, posteriormente, células da crista neural migram para formar a medula (Yates et al., 2013; Ross et al., 2015). Durante seu desenvolvimento pré-natal, o córtex é dividido em duas regiões, a mais externa é chamada de córtex definitivo e está quiescente nesse período, e a mais interna é chamada de córtex fetal, produzindo altos níveis de enzimas esteroidogênicas, sintetizando o hormônio desidroepiandrosterona (DHEA) em humanos e pregnenolona em camundongos, e auxiliando na síntese de estrogênio pela placenta, importante para a manutenção da gestação (Mesiano & Jaffe, 1997). Uma zona intermediária aparece logo antes do nascimento com a função de produzir altos níveis de cortisol, essencial para a maturação normal dos pulmões do bebê e desenvolvimento de órgãos como tireoide, rins, cérebro e hipófise (Levine, 1957; Fowden, 1998; Kapoor et al, 2008). Após o nascimento, a zona fetal desaparece e a zona definitiva se une à zona intermediária para se diferenciar nas 3 regiões que conhecemos (Morohashi & Zubair, 2011).

A zona reticular em camundongos é chamada de zona X em alguns estágios do desenvolvimento, é a região que envolve a medula e produz hormônios andrógenos como androstenediona (Berger et al., 2019). A zona glomerulosa é a região mais externa, próximo à cápsula, e produz o mineralocorticoide aldosterona, envolvido na manutenção da homeostase. Suas células são organizadas de forma densa e com pouco citoplasma, contendo um número limitado de gotículas lipídicas e junções gap, com abundante retículo endoplasmático liso e mitocôndrias (Nussdorfer, 1980; Pignatti et al, 2017). E a zona fasciculada é a região medial do córtex da adrenal, suas células são maiores, menos densas e com grande quantidade de retículo endoplasmático liso, possuindo muitas gotículas lipídicas, junções gap maiores e mitocôndrias (Berger et al, 2019). Sintetizam glicocorticoides (GC), dentre eles o cortisol em humanos e corticosterona em camundongos, uma classe de hormônios esteroides produzidos através da ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), por modulação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Os glicocorticoides têm uma importante resposta ao estresse, com papel na imunidade, metabolismo, desenvolvimento, comportamento e na fertilidade (Plotsky et al, 1993; Berger et al., 2019). Eles inibem a secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), de hormônio luteinizante (LH) e, conseqüentemente, regulam hormônios sexuais do sistema reprodutor, como estrógeno e testosterona (Kamel & Kubajak, 1987; Briski & Sylvester, 1991; Dagklis et al., 2015).

No testículo, as respostas mediadas por GC são geralmente inibitórias para a função gonadal e para a fertilidade, não só afetando a secreção hormonal, mas também diminuindo o número de receptores de LH nas células de Leydig e, conseqüentemente, reduzindo a produção de testosterona, além de prejudicar a expressão e função de enzimas esteroideogênicas, e promover a apoptose de LC e das células germinativas (Yazawa et al., 2000; Whirledge, 2010; Hampl & Stárka, 2020). Esses hormônios atuam nos receptores de glicocorticoide (GRs) e de mineralocorticoides (MRs) presentes nas células de Sertoli, espermatócitos, células de Leydig, células peritubulares mioides, macrófagos, fibroblastos, células da musculatura lisa e células endoteliais dos vasos sanguíneos, enfatizando seu papel para o desenvolvimento normal do testículo (Levy et al., 1989; Kaufmann, 1992; Schultz et al., 1993; Hazra et al., 2014). Estudos anteriores demonstraram que camundongos adultos com o GR inativado apresentaram células de Sertoli com

características de imaturas e em menor número, espermatócitos no início da meiose, células de Leydig com morfologia anormal, diminuição do lúmen tubular e aumento do diâmetro do túbulo seminífero, além de diminuição dos níveis séricos de FSH e LH (Hazra et al., 2014).

Os glicocorticoides sintéticos (GCs) são amplamente utilizados como anti-inflamatórios e moduladores do sistema imune para diversas doenças como asma, alergias, esclerose múltipla, artrite reumatoide, rinite alérgica, psoríase, linfoma, dentre muitas outras. Estima-se que mais de 95% de mulheres grávidas recebem alguma prescrição de medicamento durante a gestação, seja por doenças crônicas ou por ter desenvolvido alguma condição médica (Andrade et al., 2004). Corticoides em doses baixas fazem parte dos medicamentos permitidos nesse período, mas estão associados à uma maior incidência de pré-eclâmpsia, abortamento, malformações congênitas e outros efeitos adversos quando administrados no primeiro trimestre de gestação (Fitzsimons et al., 1986). Além disso, atualmente glicocorticoides como Dexametasona ou Betametasona são utilizados como tratamento para mulheres com risco de parto prematuro, para promover a maturação do pulmão do feto e reduzir o risco do aparecimento de problemas respiratórios após o nascimento (Roberts & Dalziel, 2006). Dados clínicos demonstram que a exposição fetal a glicocorticoides sintéticos pode estar associada com efeitos nocivos durante o parto, problemas cognitivos e comportamentais ao longo da vida, além de alterações no desenvolvimento endócrino e na função placentária (Crowther et al., 2007; Newnham et al., 2009). Ainda, estudos anteriores demonstram efeitos dessa exposição fetal no rato adulto, como diminuição dos níveis de FSH e aumento de LH, aumento do peso testicular e da vesícula seminal, diminuição da fertilidade após inseminação artificial, diminuição do número de espermatozoides no testículo, da morfologia normal e da motilidade progressiva (Borges et al., 2017). Portanto, a exposição fetal a GC em excesso, seja por estresse materno ou por tratamento com glicocorticoide sintético, pode alterar o desenvolvimento normal do feto, levando a uma reprogramação do eixo HPA e alterando sua atividade, o que pode gerar impactos e aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças na vida adulta (Challis et al., 2000; Sloboda et al., 2005; Kapoor et al., 2008).

Sabendo da importância dos glicocorticoides para várias funções no corpo e entendendo os efeitos desses hormônios nas funções reprodutivas, surgiu a

necessidade de maiores estudos acerca do papel dos GC na regulação morfofuncional do testículo e nos parâmetros espermáticos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito da exposição pré-natal ao glicocorticoide Dexametasona no desenvolvimento do testículo de camundongos com 1, 35 e 70 dias pós-natal (dpn), que configuram neonato, púbere e adulto, respectivamente.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar histomorfometricamente o testículo com ênfase nos seguintes parâmetros:
  - determinação da proporção volumétrica e do volume líquido ocupado pelos diferentes componentes do parênquima testicular;
  - cálculo do diâmetro tubular e comprimento total dos túbulos seminíferos;
  - cálculo do volume e número de células de Sertoli e Leydig presentes no testículo, bem como a proporção núcleo/citoplasma das células de Leydig;
  - cálculo da produção espermática diária, razões celulares e rendimento geral da espermatogênese.
- b. Avaliar a integridade morfofuncional da glândula adrenal através da altura do córtex e área total da glândula.
- c. Avaliar a qualidade espermática dos animais adultos através dos seguintes parâmetros:
  - motilidade
  - integridade de membrana e vitalidade;
  - contagem e concentração espermática;
  - morfologia;
  - fragmentação de DNA dos espermatozoides através da coloração com Laranja de Acridina;
- d. Investigar através de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (RT-PCR) a expressão dos genes StAR, 3 $\beta$ HSD, mHSD3b6, 17 $\beta$ HSD, Aromatase e INSL3 nos animais com 70 dias.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e tratamento com glicocorticoide

Camundongos selvagens da linhagem C57BL/6, procedentes do Centro de Bioterismo (Cebio) do Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) foram mantidos no biotério do Departamento de Morfologia ICB/UFMG, sob um ciclo claro/escuro de 12:12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*. Todos os animais e protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG – Protocolo 344/2022).

Os camundongos foram agrupados na proporção de 1:4 (macho:fêmea) e as fêmeas examinadas diariamente, pela manhã. A presença do tampão vaginal é o indicativo de cópula e corresponde a 0,5 dias pós-coito (dpc). As fêmeas com o tampão foram separadas e aos 15,5 dpc receberam uma dose única de Dexametasona (#4008059; Agener União, São Paulo, Brasil), pela via intraperitoneal, na concentração de 0,4mg/Kg (grupo DEX 0,4) ou 5mg/Kg (grupo DEX 5). A dose menor foi escolhida para mimetizar a dose clínica de tratamento para mulheres grávidas em risco de parto prematuro (Carbone et al., 2012), e a sobredose para provocar um efeito agudo no animal, possibilitando caracterizar os possíveis desfechos na desregulação do eixo HPA. Os animais do grupo controle não passaram por nenhuma manipulação. O tratamento aos 15,5 dpc visou contemplar o período da janela de programação da masculinização do embrião.

#### 3.2 Coleta dos tecidos e processamento

Após o nascimento, os machos foram eutanasiados com 1, 35 e 70 dpc através de injeção intraperitoneal de Tiopental Sódico (150mg/Kg) em associação com Cloridrato de Lidocaína (2,2mg/kg). Foi realizada a coleta dos testículos, epidídimo, vesícula seminal e glândula adrenal, dos quais foram obtidas as respectivas massas. Testículos e glândulas adrenais foram fixados por imersão em líquido de Bouin, incluídos em metacrilato e corados com azul de toluidina para avaliação histomorfométrica. Os testículos também foram armazenados em imersão de RNAlater para posterior processamento para RT-PCR. E os epidídimos foram utilizados para obtenção dos espermatozoides, conforme será descrito nas próximas seções.

## 3.2 Avaliação histomorfométrica

### 3.2.1 Testículos

#### **a) Proporção volumétrica e volume líquido dos componentes do testículo**

A proporção volumétrica dos componentes do testículo foi realizada no programa ImageJ v1.44 usando uma graticula com 450 pontos de intersecção. Quinze campos foram analisados e os pontos de intersecção contados no testículo foram classificados como epitélio seminífero, tunica propria, célula de Sertoli, célula de Leydig, tecido conjuntivo, vaso sanguíneo, espaço linfático e apoptose. O volume dos componentes foi determinado a partir do volume líquido do testículo, que corresponde ao seu peso líquido (peso bruto do qual é subtraído o peso equivalente da túnica albugínea, equivalente a 3,5% em camundongos) multiplicado pelo valor da densidade testicular, que é aproximadamente igual a 1 (França, 1991). Assim, o volume de cada componente foi determinado como sendo o produto entre o percentual ocupado por ele e o volume do testículo, 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

#### **b) Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero**

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno circular utilizando-se uma régua micrométrica acoplada à ocular do microscópio. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular, foi mensurada a altura do epitélio seminífero, tomada pela distância da membrana basal até a borda do lúmen. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representa a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas. Todas as medidas foram obtidas a partir da objetiva de 40x.

#### **c) Comprimento dos túbulos seminíferos**

O comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo, em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos no testículo e diâmetro médio de cada animal, empregando-se a seguinte equação:

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

onde: VTS = Volume total de túbulos seminíferos dos testículos,

$\pi R^2$  = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos

R = raio tubular (diâmetro tubular dividido por 2).

O CTT foi dividido pelo peso dos testículos para estimar o comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo

**d) *Diâmetro nuclear das células de Sertoli e Leydig e proporção núcleo/citoplasma***

O diâmetro nuclear médio das células de Sertoli e de Leydig foi obtido com o auxílio de ocular micrométrica (10x) acoplada à objetiva de 100x, o que resultou em aumento final de 1000x. Trinta núcleos de cada um dos tipos celulares foram medidos ao acaso em cada animal. A partir desses dados foi possível calcular o volume nuclear em micrômetros cúbicos ( $\mu\text{m}^3$ ) das células de Sertoli e de Leydig, de acordo com a seguinte fórmula:

$$V_{\text{nuclear}} = 4/3 \pi R^3$$

onde:  $V_{\text{nuclear}}$  = volume nuclear

R = raio nuclear (diâmetro nuclear/2)

$\pi = 3,1416$

O cálculo do volume individual das células de Leydig foi realizado utilizando ocular com retículo com 441 intersecções (pontos) por campo, em aumento de 1000x. Mil pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células de Leydig foram contados por animal, com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma. A partir dos dados assim obtidos e aplicando-se as fórmulas abaixo, foram calculados o volume citoplasmático e o volume de cada célula de Leydig por animal.

Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos ( $\mu\text{m}^3$ ).

Volume citoplasmático = (%citoplasma x volume nuclear) / % núcleo

Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático

**e) Número das células de Leydig e Sertoli, e capacidade de suporte das SC.**

De posse do volume ( $\mu\text{m}^3$ ) das células de Leydig, da proporção volumétrica (%) das mesmas no testículo, e do volume total (ml) ocupado por estas células no testículo, foi calculado o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, em cada animal.

$$NC = (V/V_n)/PT$$

onde: NC = número total de células

V = volume líquido pelo tipo celular no parênquima testicular

$V_n$  = volume celular da célula de Leydig

PT = média do peso líquido do testículo

Para os animais de 01 e 35 dias, o cálculo do número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo seguiu a mesma metodologia utilizada para a obtenção dos valores destes mesmos parâmetros das células de Leydig. Entretanto, uma vez que o componente da célula de Sertoli comumente avaliado morfometricamente é o núcleo, foram considerados para o cálculo o volume nuclear das células de Sertoli, da proporção ocupada pelos núcleos no epitélio seminífero, e do volume nuclear total.

A capacidade de suporte relativa das células de Sertoli foi obtida por meio da relação entre o volume total de epitélio germinativo e o volume nuclear total da célula de Sertoli.

**f) Contagem do número de células germinativas e de Sertoli no estágio VII do CES, e razões entre números celulares obtidos para os animais com 70 dias.**

A contagem do número de células germinativas foi obtida em 10 secções transversais de túbulos seminíferos com o perfil mais arredondado possível, no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero e em aumento de 1000x. Foram avaliados espermátocitos primários em paquíteno, espermátides arredondadas e nucléolo da célula de Sertoli. Todas as contagens obtidas para as células da linhagem espermatogênica foram corrigidas para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann & Almquist (1962), conforme segue:

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

onde: DM = diâmetro nuclear médio

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

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

A partir das contagens celulares feitas no estágio VII foram calculadas as razões entre os números corrigidos de células espermatogênicas e entre estas últimas e as células de Sertoli. As seguintes razões baseadas nas contagens feitas no estágio VII foram obtidas:

Índice meiótico = Espermátides arredondadas/espermátocitos primários em paquíteno

Índice apoptótico = diferença entre o número esperado de espermátides arredondadas (4) por espermatócito primário e o número real calculado, representado em porcentagem.

Eficiência da célula de Sertoli = Espermatídios arredondados/nucléolos de célula de Sertoli

### ***g) Produção espermática diária***

A estimativa da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foi feita utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{PED} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de SC por testículo} \times \text{ICS} \times \text{frequência do estágio VII (\%)}}{\text{Duração do estágio VII (dias)}}$$

onde: PED = produção espermática diária

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

PED por grama de testículo = PED/ peso líquido do testículo

Para o cálculo da produção espermática diária foi utilizada a duração do CES para a linhagem C57BL/6 (8,7 dias) já determinada no Laboratório de Biologia Celular ICB/UFMG (Avelar et al., 2004; Oliveira et al., 2020). Deste modo, a duração do estágio VII (dias) de cada animal investigado foi obtida a partir da multiplicação da frequência deste estágio pela duração de um ciclo espermatogênico

### **3.3.2 Glândula adrenal**

A altura/espessura do córtex glandular corresponde à média obtida a partir da mensuração dos dois eixos perpendiculares. Esta medida foi obtida para cada um dos animais. Para o cálculo da área da secção transversal da glândula, utilizou-se a fórmula da área do círculo, isto é:

$$\text{Área} = \pi R^2$$

onde:  $R = \text{diâmetro}/2$ .

De posse do diâmetro correspondente à medula da glândula, calculou-se a área dessa região. Subtraindo-se da área total o equivalente a área medular, obtivemos a área referente ao córtex. O cálculo do volume das diferentes regiões foi desenvolvido utilizando-se a fórmula do volume da esfera, conforme já indicado neste Material e Métodos.

### **3.4 Transcrição reversa - Reação da cadeia de polimerase (RT-PCR)**

Para avaliarmos a expressão de genes chaves na via da síntese de esteroides sexuais, 3 $\beta$ HSD, StAR, Aromatase (CYP19A1), mHSD3b6 (3 $\beta$ HSD6), 17 $\beta$ HSD e INSL3 foram analisados por PCR em duplicata através do iTaq Universal SYBR Green Supermix, utilizando 26S, Beta-actina e GAPDH como genes de referência.

Testículos dos animais de 70 dias foram armazenados em RNALater em freezer -20°C até o momento da extração. O RNA total foi extraído usando TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e homogeneizador mecânico. Após essa etapa, o homogenato contendo o RNA foi tratado com DNase para eliminar contaminações da amostra e sua concentração foi determinada por espectrofotometria em NanoDrop 2000 (NanoDrop Inc., Wilmington, DE, EUA). Depois disso, o volume correspondente a 2  $\mu$ g de RNA foi submetido a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia de polimerase (PCR) para síntese de cDNA. Por fim, a qPCR foi realizada usando SYBR Green Supermix 240 (Bio-Rad, Marnes la Coquette, França) e cada ensaio foi replicado com os mesmos parâmetros. Os dados foram normalizados para GAPDH, como gene de referência, uma vez que este apresentou um padrão de expressão constante nas condições analisadas, comparado aos demais (26S e Beta-actina) Todos os procedimentos foram realizados conforme descrito por Moraes et al., 2017.

As sequências escolhidas para a análise do nível relativo do mRNA testicular (Tabela 1) foram obtidas no PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primer-bank>) e os primers para 3 $\beta$ HSD, StAR, Aromatase, mHSD3b6, 17 $\beta$ HSD e INSL3 foram sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT®).

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na RT-PCR.

Primers	Forward	Reverse
Rps26S	5' CGT GCT TCC CAA GCT CTA TGT 3'	5' CGA TTC CTG ACA ACC TTG CTA TG 3'
Beta-actina	5' GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG 3'	5' GCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T 3'
Gapdh	5' AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG 3'	5' TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA 3'
3βHSD	5' TGC AGA CAA AGA CCA AGG TG 3'	5' ACA GCA GCA GTG TGG ATG AC 3'
StAR	5' TGT CTC CCA CTG CAT AGC TG 3'	5' TGT TCG TAG CTG CTG GTG TC 3'
Aromatase	5' GCC CAA TGA ATT TAC CCT CGA 3'	5' GTA CCT TGG TGT CCT TTA TAG CCT 3'
mHSD3b6	5' TTC TCG GTT GTA CGG GCA AA 3'	5' CAG CTG GAA TCA GGG CAG AA 3'
17βHSD	5' GAT GTG GCT GTC AAC TGT GC 3'	5' TTG ATA ACC CGC TGG AAG TC 3'
INSL3	5' GCTGCTACTGATGCTCCTGG 3'	5' GTCTCTGCTCTAGCCACTGC 3'

### 3.5 Avaliação espermática

Os espermatozoides foram obtidos através da dissecação dos epidídimos e diluídos em solução de 9% leite em pó desnatado com PBS. Todas as análises foram realizadas em acordo com protocolo previamente padronizado em nosso laboratório (Vieira et al., submetido) em microscópio óptico Olympus BX-60, no aumento de 400x.

O teste de integridade de membrana foi realizado a partir da adição de 5uL de eosina (0,5% de eosina Y dissolvida em 0,9% de solução salina de NaCl) em 5uL da suspensão espermática sobre lâmina de vidro a qual foi recoberta com uma lamínula 22mm x 22mm. Os espermatozoides corados foram considerados com a membrana plasmática danificada ou muito permeável, e os não corados foram contados como íntegros. A motilidade foi avaliada usando 10uL da amostra espermática e foram classificados como progressivos, não progressivos ou imóveis. Em ambos os parâmetros, foram avaliados 200 espermatozoides e obtida a porcentagem correspondente à cada classificação. Se houvesse aglutinação presente, ela foi avaliada como isolada, moderada, alta ou bruta.

A concentração foi calculada utilizando 10uL da suspensão de espermatozoides imobilizados com 1uL de Glutaraldeído, e avaliada no grid central da câmara de Neubauer 4x4, em que pelo menos 200 espermatozoides foram contados em colunas completas. Foi usada a fórmula  $C = (N/n) \times (1/25) \times FD$ , que representa o número de espermatozoides (N) dividido pelo número de colunas contadas (n), multiplicado por 1/25 e pelo fator de diluição (FD; no caso de 1:50, FD=50).



A morfologia foi analisada através do esfregaço de espermatozoides, fixado em álcool 95% por 15 minutos e corado com Hematoxilina e Eosina por imersão de 5 minutos em cada corante. Os espermatozoides foram classificados como normais e anormais, sendo categorizados os defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda. Assim, os defeitos de cabeça incluem: sem gancho, banana-like, mais fino, amorfo, macrocéfalo, duas cabeças ou sem cabeça; os defeitos de peça intermediária: inserção irregular, mais grossa, menor ou somente a peça; e por fim, os defeitos de cauda contemplam dobrados, enrolados e duas caudas.

### **3.6 Fragmentação do DNA**

Para análise da fragmentação do DNA, os esfregaços de espermatozoides fixados em paraformaldeído 4% foram corados em imersão de 5 minutos com solução de Laranja de Acridina (0,1% em ácido cítrico e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). As lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência em filtro de excitação 460-570nm e emissão de 460-610nm, sob aumento de 1000X. Para cada animal foram contadas 500 células, sendo as que emitiram fluorescência verde consideradas normais, enquanto as que emitiram fluorescência vermelha ou laranja foram consideradas anormais, indicando desnaturação total ou parcial da cromatina. O controle positivo foi realizado com 7%  $\text{H}_2\text{O}_2$  + buffer ácido (pH 1,2).

### **3.7 Análises estatísticas**

Para a análise estatística os dados foram testados quanto à normalidade, utilizando o teste D'Agostino. Os dados que atenderam a distribuição normal foram avaliados através de one-way ANOVA e as médias comparadas com o pós-teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram avaliados por meio do teste Kruskal Wallis e o pós-teste de Dunn. Todas as análises foram conduzidas no programa de estatística GraphPad Prism versão 6.0, sendo o nível de significância considerado  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Biometria

Nos animais neonatos não foi observada uma diferença significativa no peso corporal e no peso testicular dos animais avaliados, no entanto, houve um aumento do índice gonadossomático no grupo DEX 0,4 comparado aos outros grupos, assim como um aumento significativo no índice anogenital desse grupo em relação ao grupo controle (Tabela 2). Para os indivíduos púberes, isto é, aos 35 dpn, houve um aumento significativo no peso corporal, peso testicular e no índice gonadossomático dos grupos tratados com Dexametasona em ambas as concentrações.

Tabela 2. Dados biométricos (média  $\pm$  SEM) em camundongos neonatos (1 dia), púberes (35 dias) e adultos (70 dias) expostos às diferentes doses de glicocorticoides e grupo controle.

Parâmetros	Controle	DEX 0,4	DEX 5
1 dia			
Peso corporal (g)	1,43 $\pm$ 0,05	1,27 $\pm$ 0,04	1,42 $\pm$ 0,03
Peso testicular (mg)	0,93 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,1	1,11 $\pm$ 0,05
Índice gonadossomático (%)	0,14 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,14 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
35 dias			
Peso corporal (g)	11,16 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>	15,57 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	16,51 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>
Peso testicular (mg)	23,37 $\pm$ 5,98 <sup>a</sup>	49,17 $\pm$ 2,20 <sup>b</sup>	57,50 $\pm$ 2,79 <sup>b</sup>
Índice gonadossomático (%)	0,34 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,58 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,69 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
Epidídimo (mg)	6,68 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	13,20 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>	18,13 $\pm$ 1,43 <sup>c</sup>
Glândula adrenal (mg)	1,78 $\pm$ 0,26	2,50 $\pm$ 0,40	2,00 $\pm$ 0,20
70 dias			
Peso corporal (g)	25,39 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	24,73 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	27,04 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>
Peso testicular (mg)	101,37 $\pm$ 2,81 <sup>a</sup>	102,43 $\pm$ 3,09 <sup>a</sup>	113,83 $\pm$ 2,29 <sup>b</sup>
Índice gonadossomático (%)	0,82 $\pm$ 0,02	0,86 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,01
Vesícula seminal (mg)	197,70 $\pm$ 7,78 <sup>a</sup>	221,27 $\pm$ 6,02 <sup>ab</sup>	250,17 $\pm$ 12,94 <sup>b</sup>
Epidídimo (mg)	40,91 $\pm$ 1,52	42,65 $\pm$ 1,78	44,46 $\pm$ 1,11
Índice AGD (%)	3,77 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	4,21 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>	4,45 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
Glândula adrenal (mg)	5,47 $\pm$ 0,31	3,17 $\pm$ 0,33	5,84 $\pm$ 0,55

Também foi possível observar um aumento no peso da vesícula seminal do grupo DEX 0,4 comparado aos outros, e um maior índice anogenital no grupo que recebeu 5mg/kg de Dexametasona comparado ao controle. Em relação ao peso do epidídimo, o grupo DEX 0,4 foi significativamente maior do que o grupo sem manipulação e menor do que o grupo DEX 5, representando uma diferença estatística entre os 3 grupos. Contudo, os experimentos com essa categoria ainda estão em andamento, a fim de completar o grupo DEX 5 que no momento só possui 3 indivíduos (Tabela 2). Nos adultos, o grupo que recebeu uma sobredose de Dexametasona destacou-se pelos maiores pesos corporal e testicular quando comparados à DEX 0,4 e ao grupo sem manipulação, assim como um maior peso da vesícula seminal e do índice anogenital desse grupo comparado ao controle. Não houve diferença significativa no índice gonadossomático e no peso do epidídimo (Tabela 2).

#### 4.2 Histomorfometria testicular

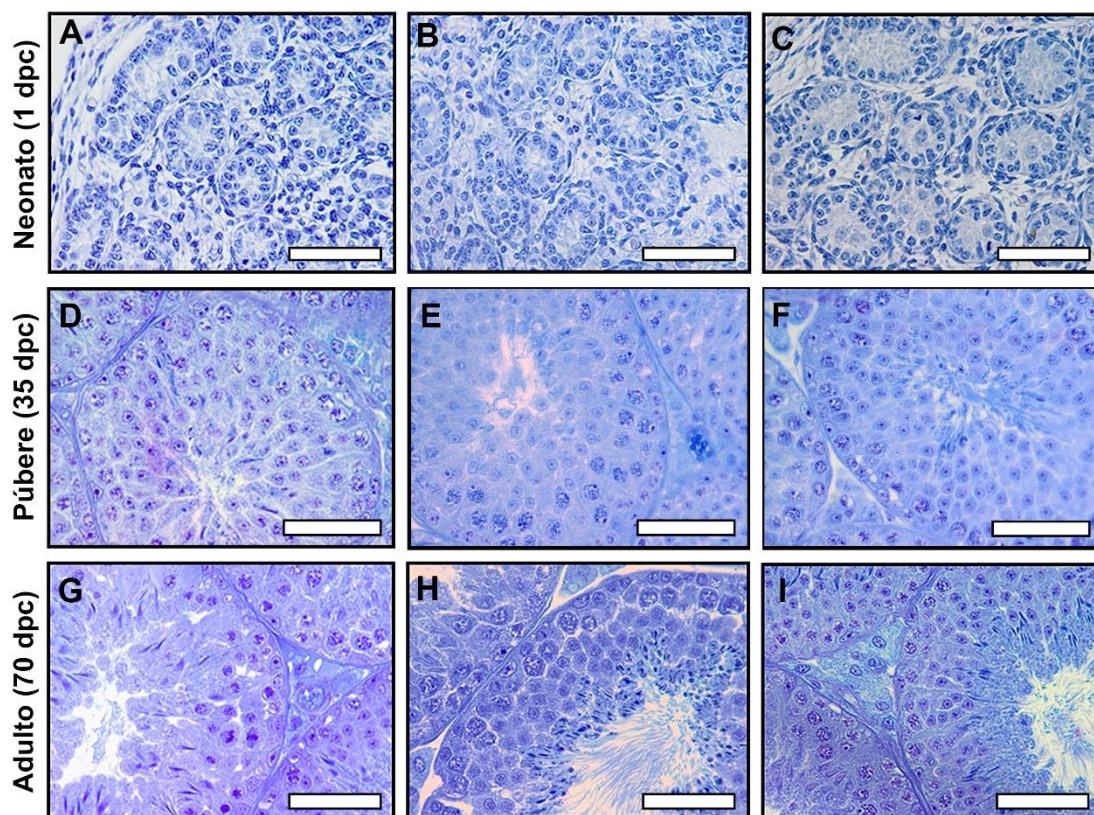


Figura 1. Morfologia do testículo. A-C: animais neonatos grupos controle, DEX 0,4 e DEX 5 respectivamente. D-F: animais púberes com 35 dias, grupos controle, DEX 0,4 e DEX 5,

respectivamente. G-I: animais adultos grupos controle, DEX 0,4 e DEX 5 respectivamente. Barras = 50  $\mu$ m.

A Figura 1 ilustra o parênquima dos testículos nas condições experimentais avaliadas no presente estudo. É possível observar nos neonatos e adultos que, qualitativamente, a composição do parênquima não sofreu alterações marcantes e o desenvolvimento da espermatogênese nos testículos dos animais dos grupos tratados está de acordo com o observado para os controles não manipulados. No entanto, os indivíduos púberes que receberam Dexametasona apresentaram túbulos com espermatogênese em estágio mais avançado que o grupo controle. Essa diferença vai ser melhor descrita à frente no tópico 4.2.3.

#### **4.2.1 Compartimento cordonal/tubular**

Nos neonatos, a proporção volumétrica do epitélio germinativo é menor no grupo DEX 0,4 em comparação à maior dosagem de Dexametasona, assim como uma tendência a um maior epitélio seminífero em DEX 5, que constitui o epitélio de células germinativas espermatogoniais e células de Sertoli. Também é possível observar uma diminuição no volume líquido da tunica própria no grupo DEX 0,4 em relação ao controle. Porém, não houve diferença significativa em relação aos outros parâmetros analisados de compartimento cordonal, tunica própria e células de Sertoli (Tabela 3, Figura 2).

Nos indivíduos de 35 dias, é possível observar um aumento significativo no volume líquido dos animais tratados com as duas dosagens de Dexametasona em relação ao controle em todos os parâmetros analisados: célula de Sertoli, lume e tunica própria. No espaço tubular e epitélio seminífero, o grupo DEX 4 é significativamente maior do que o controle e menor do que DEX 5, havendo uma diferença entre todos os grupos analisados (Tabela 4, Figura 3).

Tabela 3. Dados morfométricos (média  $\pm$  SEM) do compartimento cordonal do testículo de camundongos com 1 dia expostos a diferentes doses de glicocorticoides e grupos controle.

Parâmetros	Controle	DEX 0,4	DEX 5
Compartimento cordonal (%)	67,0 $\pm$ 8,6	60,2 $\pm$ 2,4	76,3 $\pm$ 3,1
Epitélio seminífero (%)	48,5 $\pm$ 4,6	47,8 $\pm$ 2,3	59,4 $\pm$ 1,7
Epitélio germinativo (%)	33,5 $\pm$ 3,9 <sup>ab</sup>	25,2 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>	35,1 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>
Túnica própria (%)	12,6 $\pm$ 0,9	12,4 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 0,6
Apoptose (%)	0,01 $\pm$ 0	0,0 $\pm$ 0	0,01 $\pm$ 0,01
Volume nuclear célula de Sertoli	115,7 $\pm$ 5,6	102,1 $\pm$ 2,3	110,2 $\pm$ 5,3
Número de SC no testículo	1,8 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1
Número de SC/g de testículo	1907 $\pm$ 177	1887 $\pm$ 178	1928 $\pm$ 190
Diâmetro cordonal ( $\mu$ m)	36,5 $\pm$ 0,9	36,0 $\pm$ 0,6	38,9 $\pm$ 1,17
Comprimento cordonal (m)	0,6 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 0,03
Comprimento cordonal por grama de testículo (m)	611,8 $\pm$ 40	510,7 $\pm$ 59,5	557,2 $\pm$ 60,7
Capacidade de suporte relativa de célula de Sertoli	1,44 $\pm$ 0,16	1,12 $\pm$ 0,1	1,44 $\pm$ 0,0

Tabela 4. Dados morfométricos (média  $\pm$  SEM) do compartimento cordonal do testículo de camundongos com 35 dias expostos a diferentes doses de glicocorticoides e grupos controle.

Parâmetros	Controle	DEX 0,4	DEX 5
Compartimento tubular (%)	94,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	92,0 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	93,7 $\pm$ 0,7 <sup>ab</sup>
Epitélio seminífero (%)	87,3 $\pm$ 1,0	84,4 $\pm$ 0,8	84,4 $\pm$ 1,3
Epitélio germinativo (%)	84,6 $\pm$ 1,4	82,4 $\pm$ 0,9	82,0 $\pm$ 1,7
Túnica própria (%)	2,6 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,2
Lumen (%)	4,6 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 1,4
Volume nuclear célula de Sertoli	371,2 $\pm$ 38,1 <sup>a</sup>	412,3 $\pm$ 21,6 <sup>b</sup>	455,6 $\pm$ 35,2 <sup>b</sup>
Número de SC no testículo	0,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	2,0 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>
Número de SC/g de testículo	63,5 $\pm$ 25,2	46,6 $\pm$ 4,2	35,5 $\pm$ 4,1
Volume nuclear célula de Leydig	158,2 $\pm$ 13,3 <sup>a</sup>	180,5 $\pm$ 6,9 <sup>b</sup>	187,6 $\pm$ 6,8 <sup>b</sup>
Diâmetro tubular ( $\mu$ m)	153,7 $\pm$ 12,2 <sup>a</sup>	198,2 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>	218,4 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>
Capacidade de suporte relativa de célula de Sertoli	34,8 $\pm$ 5,5	45,9 $\pm$ 4,9	45,7 $\pm$ 3,9

Nos animais adultos, a proporção volumétrica da tunica própria foi menor no grupo DEX 0,4 quando comparado ao grupo controle, assim como o volume líquido do epitélio seminífero foi menor nesse mesmo grupo comparado a DEX 5. Também se observa uma diminuição do comprimento total do túbulo seminífero por grama de testículo no grupo que recebeu a maior dose de Dexametasona comparado aos outros

grupos experimentais. Não houve diferença significativa nos parâmetros da célula de Sertoli nos grupos analisados (Tabela 5, Figura 4)

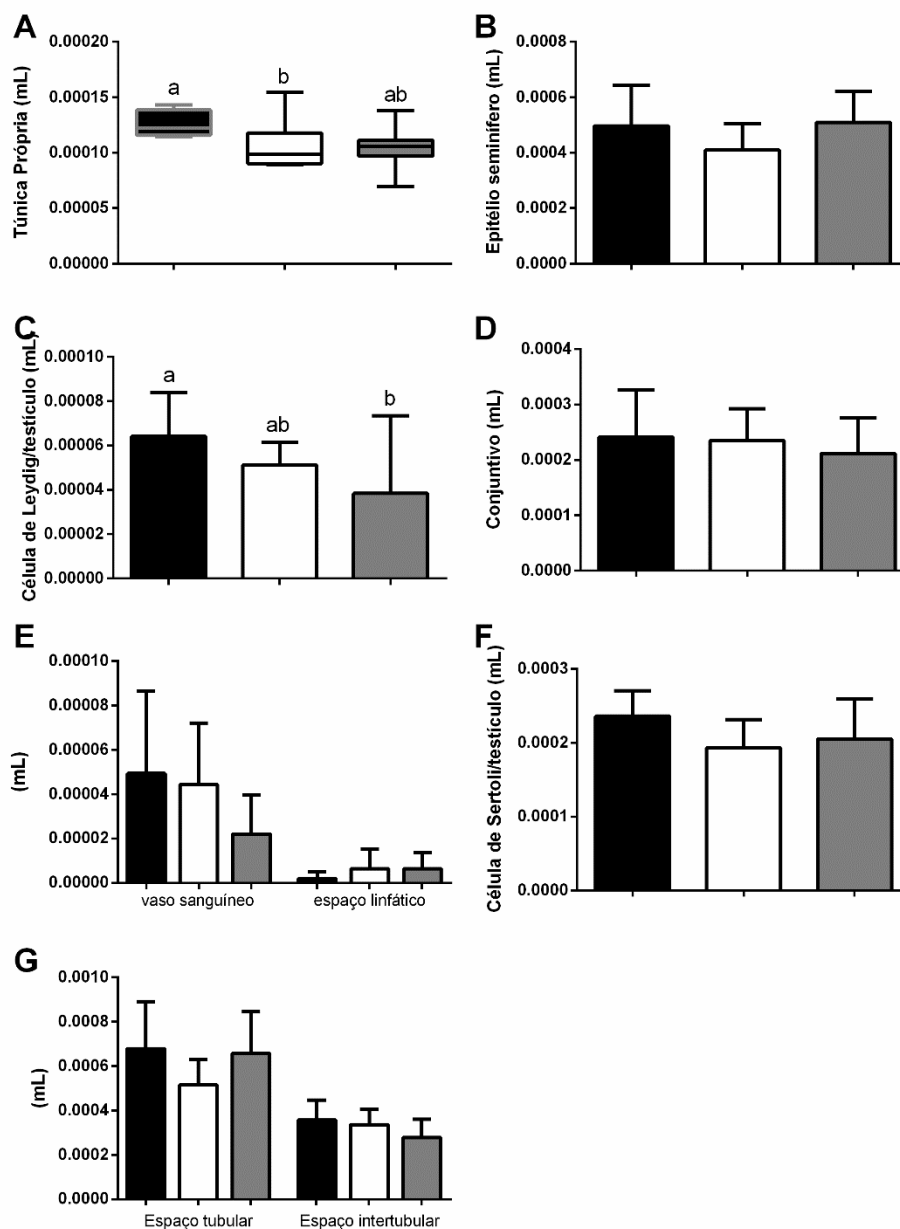


Figura 2. Volume líquido dos componentes do testículo de animais neonatos (1 dpc). Tunica própria (A), epitélio seminífero (B), célula de Leydig (C), células do tecido conjuntivo (D), vaso sanguíneo e linfático (E), células de Sertoli (F), e espaço cordonal e intersticial (G). Barras na cor preta representa o grupo controle (n=6), cor branca representa o grupo DEX 0,4 (n=6) e cor cinza representa o grupo DEX 5 (n=6). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas (p<0,05).

Tabela 5. Dados morfométricos (média  $\pm$  SEM) do compartimento cordonal do testículo de camundongos com 70 dias expostos a diferentes doses de glicocorticoides e grupos controle.

Parâmetros	Controle	DEX 0.4	DEX 5
Compartimento tubular (%)	91,7 $\pm$ 0,5	91,7 $\pm$ 0,7	89,6 $\pm$ 0,9
Epitélio seminífero (%)	79,5 $\pm$ 0,6	78,3 $\pm$ 1,4	77,8 $\pm$ 0,5
Epitélio germinativo (%)	77,7 $\pm$ 0,6	76,7 $\pm$ 1,4	76,1 $\pm$ 0,6
Túnica própria (%)	3,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	3,2 $\pm$ 0,4 <sup>ab</sup>
Lumen (%)	8,5 $\pm$ 0,6	10,9 $\pm$ 0,9	8,5 $\pm$ 0,7
Volume nuclear célula de Sertoli	616,4 $\pm$ 40,3	779,7 $\pm$ 29,9	827,4 $\pm$ 32,2
Número de SC no testículo	2,8 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,2
Número de SC/g de testículo	27,9 $\pm$ 2,4	20,0 $\pm$ 1,8	20,4 $\pm$ 1,6
Diâmetro tubular ( $\mu$ m)	250,4 $\pm$ 3,7	243,2 $\pm$ 3,2	265,1 $\pm$ 4,3
Comprimento tubular (m)	1,8 $\pm$ 0,06	1,8 $\pm$ 0,08	1,8 $\pm$ 0,1
Comprimento tubular por grama de testículo (m)	18,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	19,1 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	15,7 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
Altura do epitélio seminífero ( $\mu$ m)	90,4 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	90,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	97,5 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>

#### 4.2.2 Compartimento intersticial

Nos animais com 1 dpn é possível observar uma forte tendência a uma menor proporção de espaço intercordonal no grupo DEX 5 quando comparado a DEX 0,4 ( $p=0,052$ ), assim como uma diminuição significativa no volume líquido das células de Leydig em DEX 5 comparado ao controle, acompanhado de uma tendência a menor número total dessas células, e no volume citoplasmático e celular de LC. Essa queda pode ser confirmada aumentando o número de indivíduos avaliados. Não houve diferença significativa na porcentagem de células de Leydig, de células do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos (Tabela 6, Figura 5).

Tabela 6. Dados morfométricos (média  $\pm$  SEM) do compartimento intercordonal do testículo de camundongos com 1, 35 e 70 dias expostos a diferentes doses de glicocorticoides e grupos controle.

Parâmetros (%)	Controle	DEX 0,4	DEX 5
1 dia			
Compartimento intercordonal	34,7 ± 1,9	39,6 ± 2,5	27,9 ± 1,9
Células de Leydig	6,3 ± 0,7	6,1 ± 0,5	2,7 ± 0,2
Células tecido conjuntivo	23,2 ± 1,9	27,6 ± 2,4	22,0 ± 2,1
Vasos sanguíneos	5,0 ± 1,6	5,26 ± 1,4	2,4 ± 0,7
Espaço linfático	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,3
35 dias			
Compartimento intertubular	10,1 ± 0,7	7,9 ± 0,6	6,3 ± 0,7
Células de Leydig	1,86 ± 0,27 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,4 <sup>b</sup>
Células tecido conjuntivo	2,5 ± 0,6	1,45 ± 0,2	1,6 ± 0,1
Vasos sanguíneos	1,1 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,46 ± 0,4
Espaço linfático	0,01 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,02 ± 0,0
70 dias			
Compartimento intertubular	8,1 ± 0,5	8,3 ± 0,7	9,9 ± 0,8
Células de Leydig	4,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	6,8 ± 0,7 <sup>b</sup>
Células tecido conjuntivo	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Vaso sanguíneo	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,2

Em contrapartida, os animais púberes tratados com glicocorticoide de ambos os grupos apresentaram um aumento significativo no volume líquido ocupado pelo espaço intertubular, células de Leydig, vasos sanguíneos e por células do tecido conjuntivo, comparados ao grupo sem manipulação (Tabela 6, Figura 6).

Nos adultos, o volume líquido do compartimento intertubular foi significativamente maior no grupo DEX 5 comparado a DEX 0,4, assim como a proporção volumétrica de células de Leydig foi maior nesse mesmo grupo comparado a DEX 0,4 e o grupo controle. Ainda, é possível observar um aumento do volume nuclear e celular do grupo que recebeu sobredose de Dexametasona em relação ao grupo controle, acompanhado por uma tendência a um maior volume total ( $p = 0,08$ ) das LC nessa mesma concordância. Não houve diferença significativa nos parâmetros de vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nas células do tecido conjuntivo, assim como no número de células de Leydig no testículo Tabela 6, Figura 7).



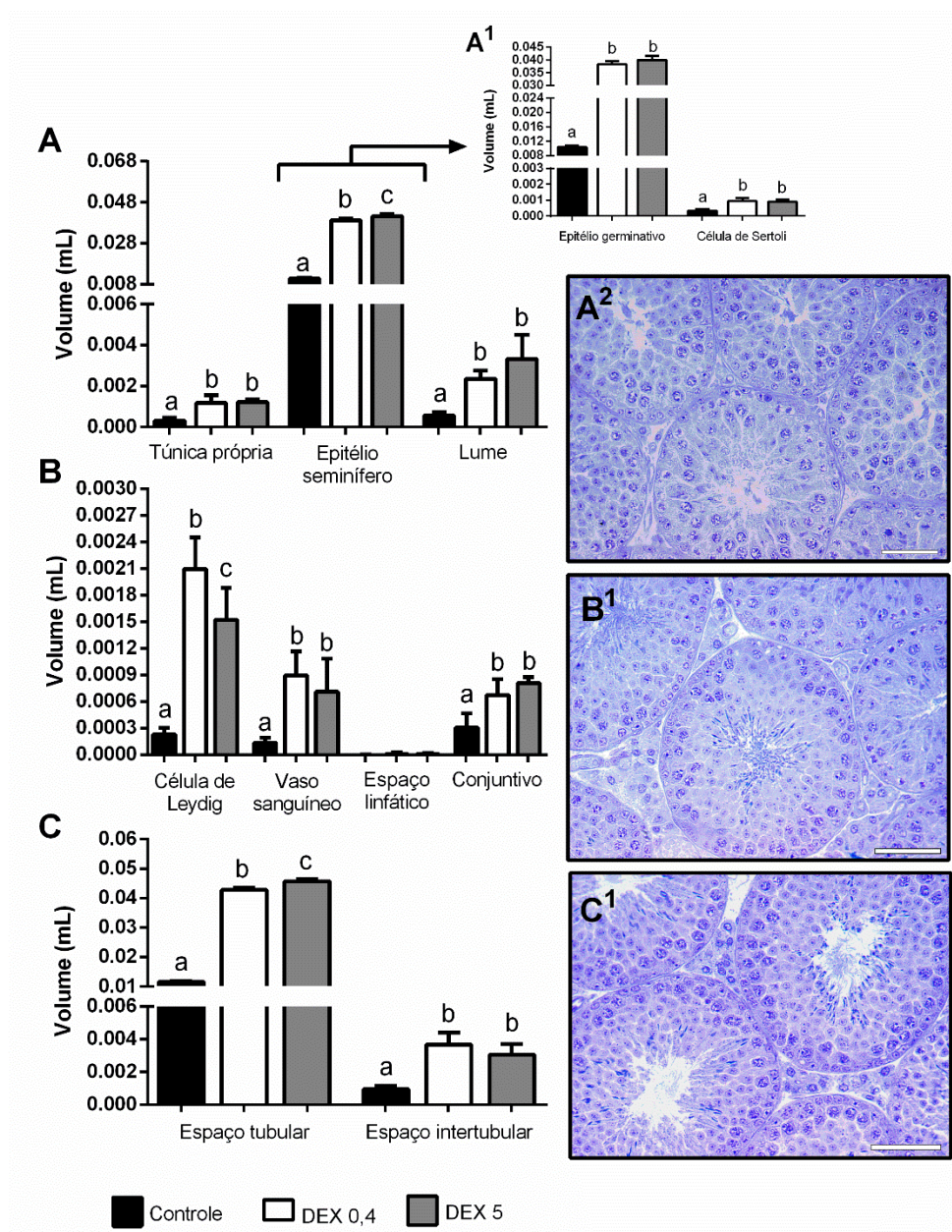


Figura 3. Volume líquido dos componentes do testículo de animais púberes (35 dpc). A: tunica própria, epitélio seminífero e lúmen. A1: epitélio germinativo e célula de Sertoli. B: célula de Leydig, vaso sanguíneo, vaso linfático e células do tecido conjuntivo. C: espaço tubular e intersticial. Morfologia do tubular do testículo de neonato (A2), púbere (B1) e adulto (C1). Barras na cor preta representam o grupo controle (n=5), cor branca representa o grupo DEX 0,4 (n=6) e cor cinza representa o grupo DEX 5 (n=3). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ). Barra = 50  $\mu$ m.

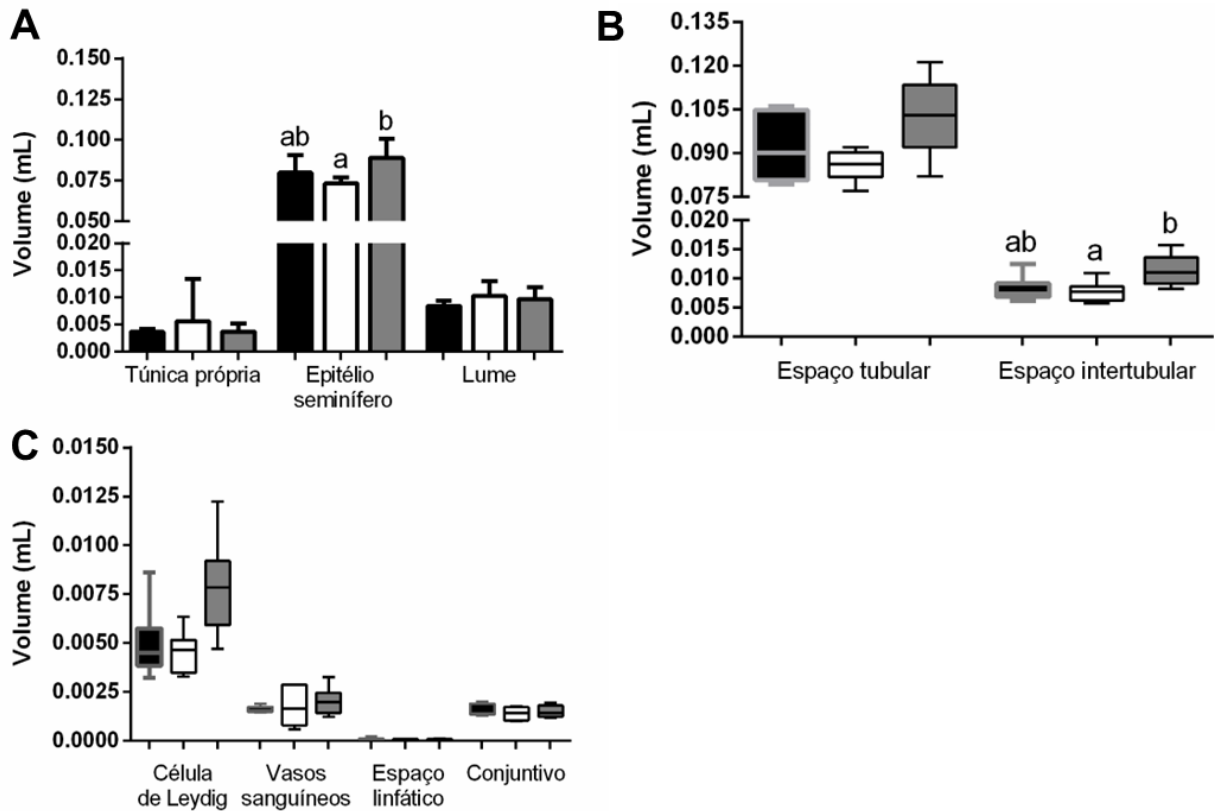


Figura 4: Volume líquido dos componentes do testículo de animais adultos (70 dpc). A: tunica própria, epitélio seminífero e lúmen. B: espaço tubular e intersticial. C: célula de Leydig, vaso sanguíneo, vaso linfático e células do tecido conjuntivo. Barras na cor preta representam o grupo controle (n=6), cor branca representa o grupo DEX 0,4 (n=6) e cor cinza representa o grupo DEX 5 (n=6). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas (p<0,05).

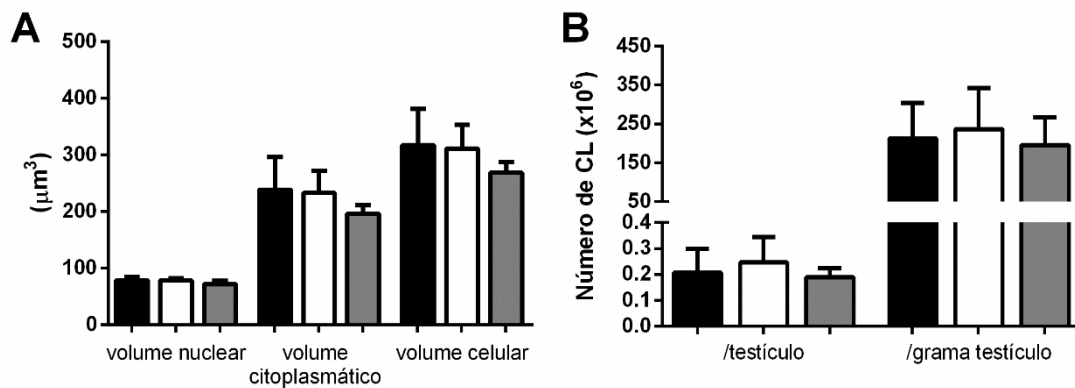


Figura 5: Parâmetros de células de Leydig (LC) em neonatos (1 dpc). A: volume nuclear, volume citoplasmático e volume celular. B: número de LC por testículo e número de LC por grama de testículo. Barras na cor preta representam o grupo controle, cor branca representa o grupo DEX 0,4 e cor cinza representa o grupo DEX 5.

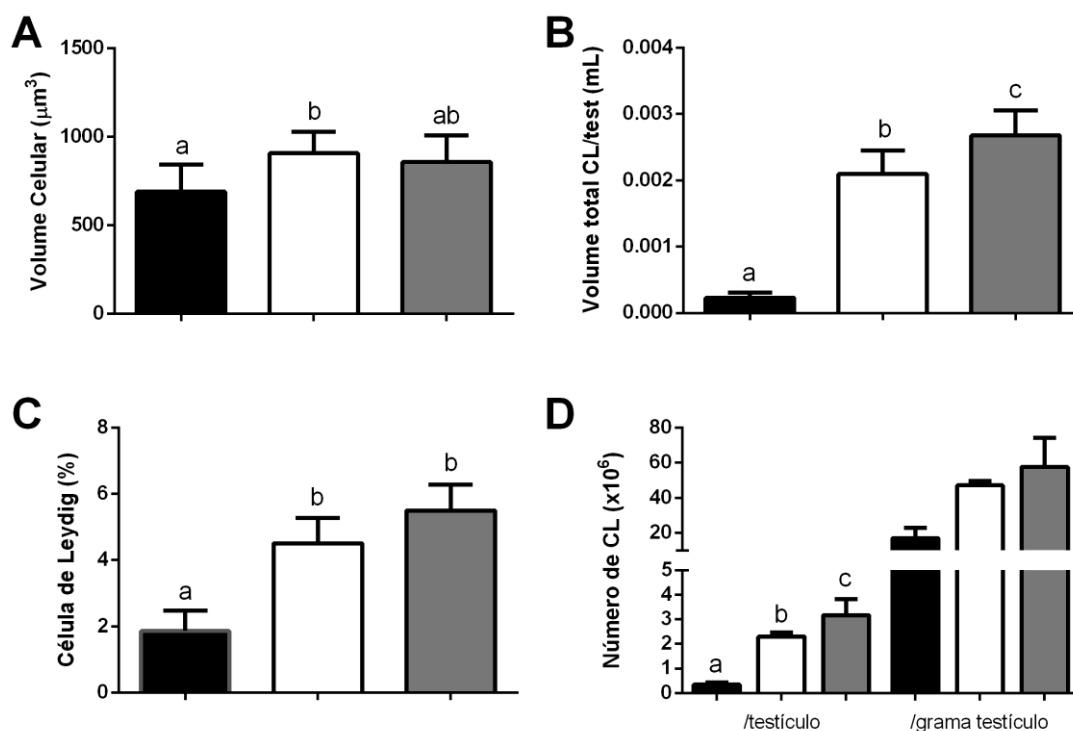


Figura 6: Parâmetros de células de Leydig (LC) em púberes (35 dpc). A: volume celular. B: volume total de LC por testículo. C: percentual de proporção volumétrica de LC. D: número de LC por testículo e número de LC por grama de testículo. Barras na cor preta representam o grupo controle, cor branca representa o grupo DEX 0,4 e cor cinza representa o grupo DEX 5. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

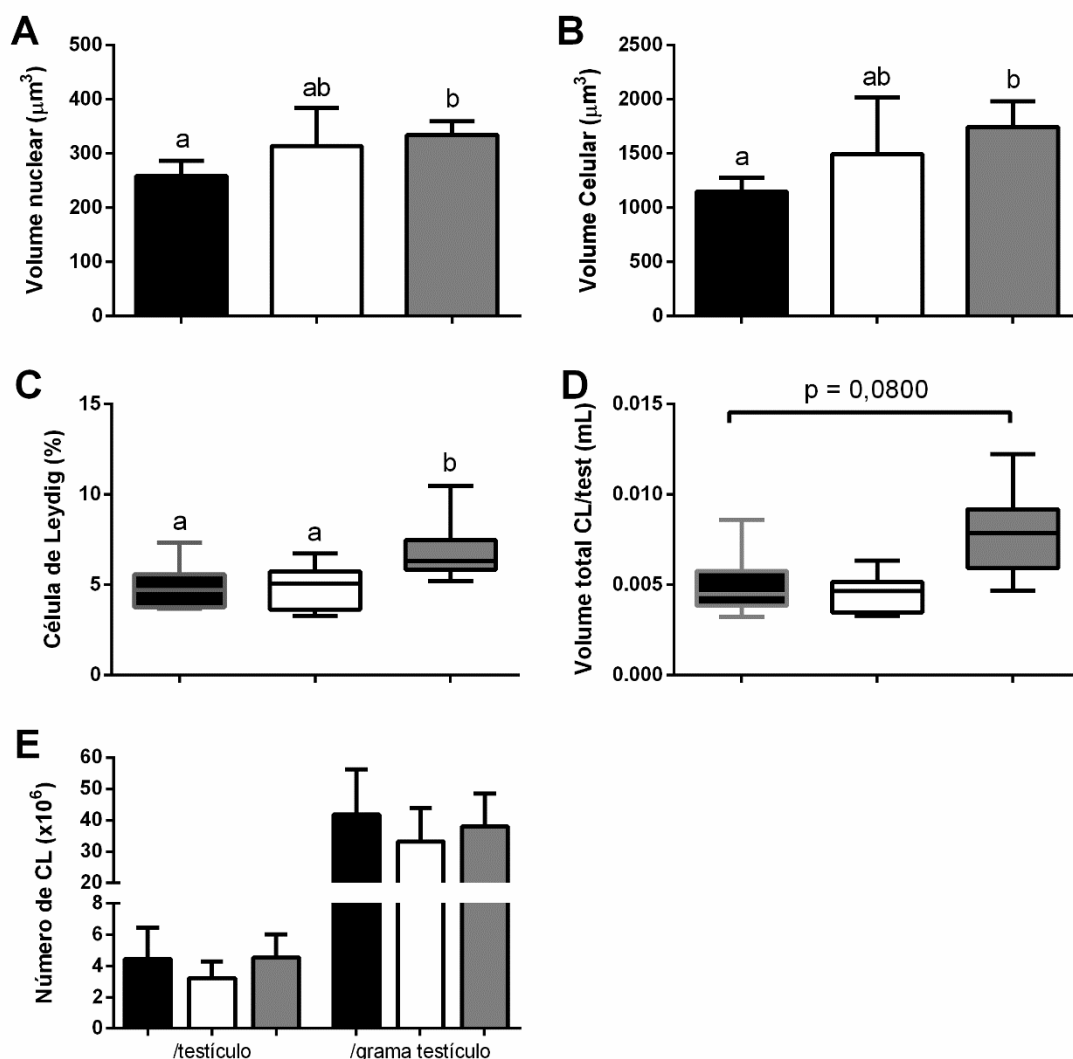


Figura 7: Parâmetros de células de Leydig (LC) em adultos (70 dpc). A: volume nuclear. B: volume celular. C: percentual de proporção volumétrica de LC. D: volume total de LC por testículo. D: número de LC por testículo e número de LC por grama de testículo. Barras na cor preta representam o grupo controle, cor branca representa o grupo DEX 0,4 e cor cinza representa o grupo DEX 5. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 Células germinativas e produção espermática diária

Nos animais neonatos, é possível observar qualitativamente que o parênquima testicular não sofreu alterações morfológicas na sua constituição e o epitélio seminífero é composto por células de Sertoli, espermatogônias e gonócitos que ainda não se diferenciaram. Nos indivíduos púberes, ambos os grupos que receberam tratamento com Dexametasona apresentaram túbulos seminíferos com

espermatogênese em estágio mais avançado que o grupo controle, com a presença de espermátides alongadas na fase 17 e 18, próximas à fase de espermição, enquanto nos animais controle, as espermátides mais avançadas ainda estavam na fase 13 e 14 (Fig 3). Indicando um avanço na puberdade dos animais tratados.

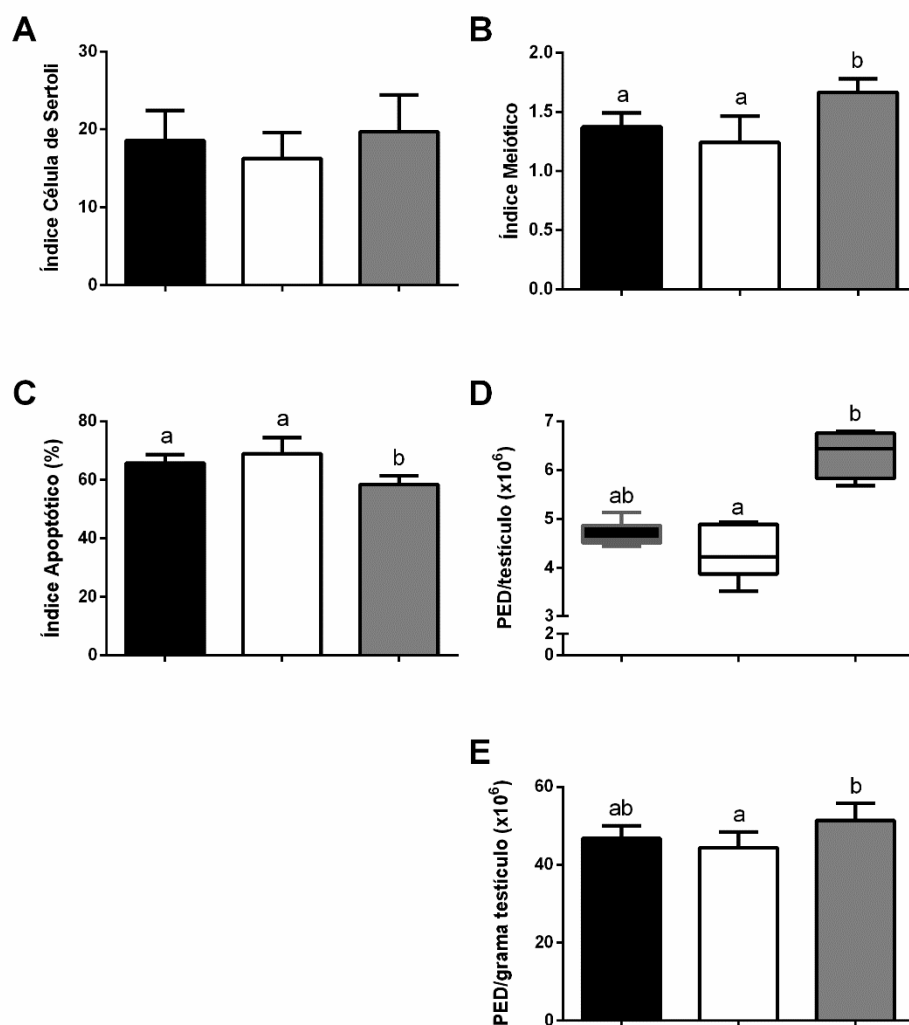


Figura 8: Razões celulares germinativas em adultos (70 dpc). A: índice de eficiência de célula de Sertoli (SC) determinado pela razão entre espermátides arredondadas e nucléolos de SC. B: índice meiótico determinado pela razão entre espermátides arredondadas e espermatócitos primários em paquíteno. C: índice apoptótico definido pelo percentual de perdas de espermátides arredondadas frente ao número máximo destas células obtido a partir de um espermatócito primário. D-E: produção espermática diária por testículo e por grama de testículo, respectivamente. Barras na cor preta representam o grupo controle, cor branca representa o grupo DEX 0,4 e cor cinza representa o grupo DEX 5. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

Nos indivíduos com 70 dpc, quantitativamente, não houve diferença significativa no índice de células de Sertoli, porém o grupo DEX 5 apresentou um maior índice meiótico do que DEX 0,4 e o grupo controle, o que representa a relação entre o número de espermátides arredondadas e o número de espermátócitos primários em paquíteno. O índice apoptótico foi menor no grupo DEX 5 comparado à menor dose de Dexametasona e o grupo sem manipulação. Por fim, observa-se uma maior produção espermática diária por testículo e por grama de testículo no grupo DEX 5 comparado aos outros grupos experimentais (Figura 8).

A capacidade de suporte relativa das células de Sertoli nos neonatos e púberes não apresentou diferença significativa entre os grupos (Tabela 3; 4). Assim como o índice de célula de Sertoli nos indivíduos adultos calculado através do número de células germinativas (Fig 8).

### **4.3 Histomorfometria da glândula adrenal**

Os dados para os diferentes parâmetros investigados da glândula adrenal não apresentaram diferenças significativas em 35 e 70 dpc, no entanto, verificamos um padrão consistente que associa o grupo DEX 0,4 com os maiores valores para a área total do córtex transversal, área do córtex, volume total da glândula e volume do córtex nos animais púberes (Figura 9), e, em contrapartida, esse mesmo grupo apresentou os menores valores para os parâmetros analisados nos animais adultos (Figura 10).

Na avaliação qualitativa, entretanto, os grupos que foram tratados com Dexametasona em ambas as idades avaliadas, apresentaram, de modo geral, diferenças na arquitetura glandular com maior presença de vacúolos nas células da zona fasciculada. Essa alteração pode indicar diferença na função e produção hormonal desses grupos.

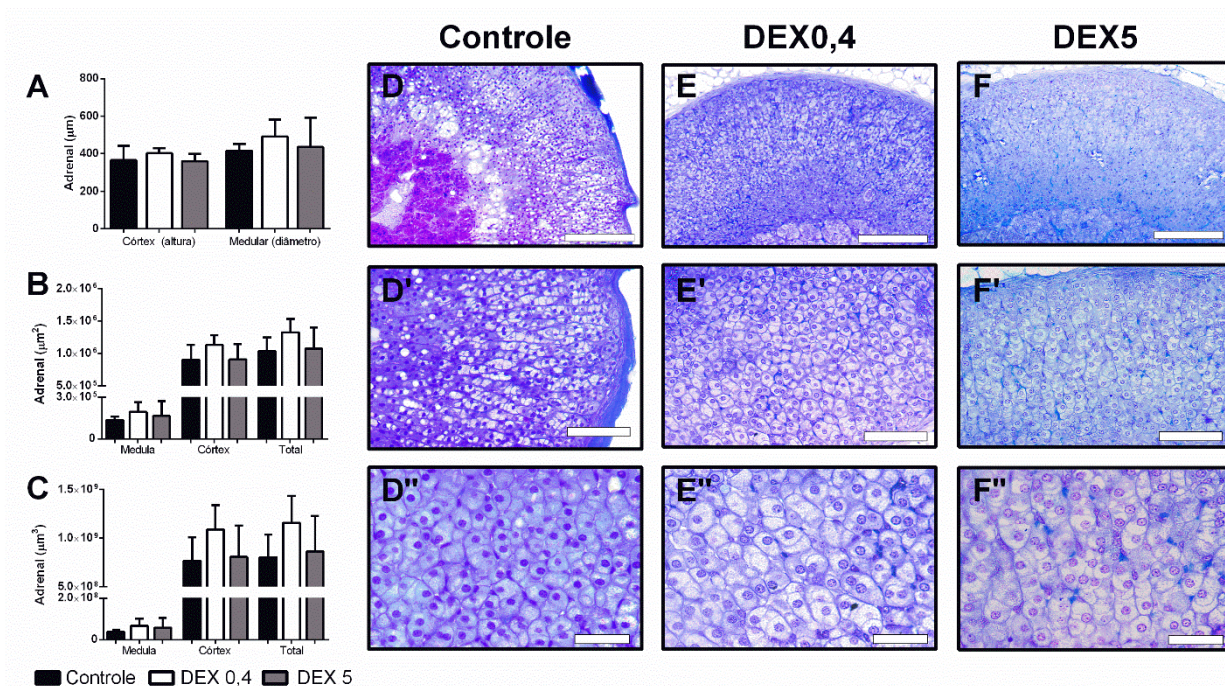


Figura 9: Morfometria da glândula adrenal nos camundongos púberes de 35 dias. A: altura do córtex e diâmetro da medula. B: área da medula, do córtex e área total da glândula. C: volume da medula, do córtex e volume total da glândula. Barras na cor preta representam o grupo controle, cor branca representa o grupo DEX 0,4 e cor cinza representa o grupo DEX 5. Morfologia glândular representando os grupos controle (D), grupo DEX 0,4 (E) e grupo DEX 5 (F) em diferentes aumentos. Barras: 200  $\mu\text{m}$  (D-F), 100  $\mu\text{m}$  (D'-F') e 50  $\mu\text{m}$  (D''-F'').

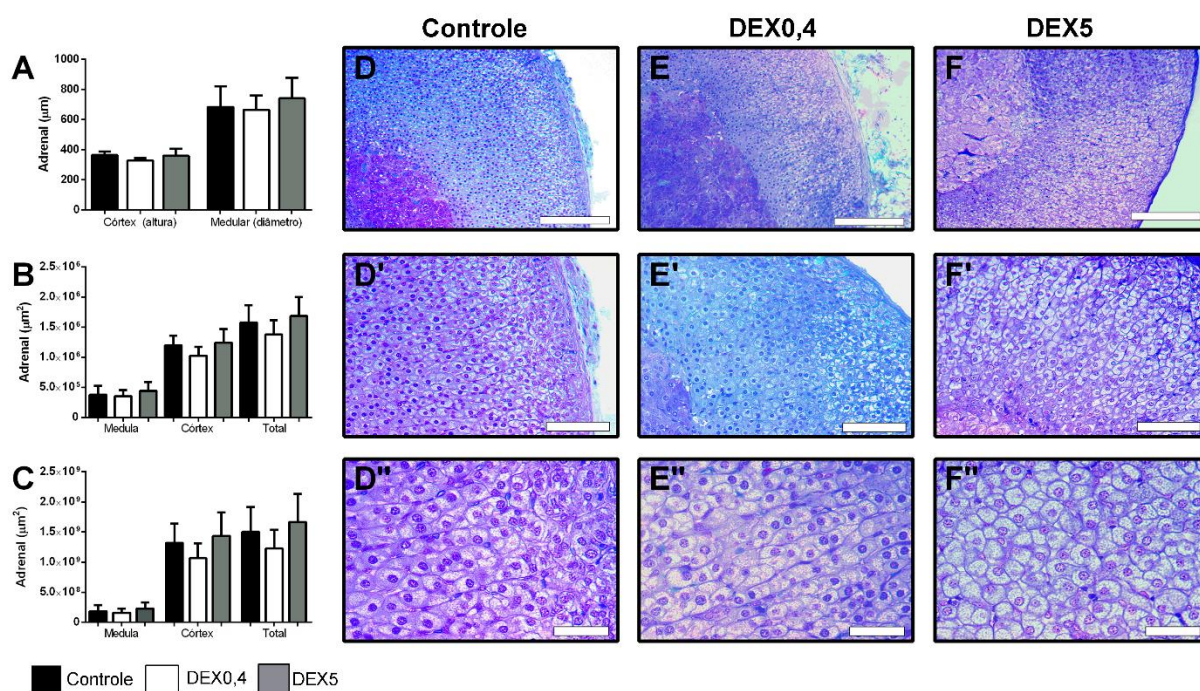


Figura 10: Morfometria da glândula adrenal nos camundongos adultos de 70 dias. A: altura do córtex e diâmetro da medula. B: área da medula, do córtex e área total da glândula. C: volume da medula, do córtex e volume total da glândula. Barras na cor preta representam o grupo controle, cor branca representa o grupo DEX 0,4 e cor cinza representa o grupo DEX 5. Morfologia glândular representando os grupos controle (D), grupo DEX 0,4 (E) e grupo DEX 5 (F) em diferentes aumentos. Barras: 200  $\mu\text{m}$  (D-F), 100  $\mu\text{m}$  (D'-F') e 50  $\mu\text{m}$  (D''-F'').

#### 4.4 RT-PCR

Não foram observadas diferenças significativas no padrão de expressão dos genes analisados embora tenhamos verificado tendências. Assim, em ambos os grupos tratados é possível pressupor uma tendência a diminuição na expressão de  $3\beta\text{HSD}$ ,  $m\text{HSD}3b6$  ( $3\beta\text{HSD}6$ ),  $17\beta\text{HSD}$  e Aromatase ( $\text{CYP}19A1$ ) comparados ao controle, assim como uma diminuição de  $\text{StAR}$  no grupo DEX 5. Em relação ao gene  $\text{INSL}3$ , que está relacionado com o número de células de Leydig presentes no testículo, observou-se uma redução de expressão nos animais do grupo DEX5 (Figura 11).

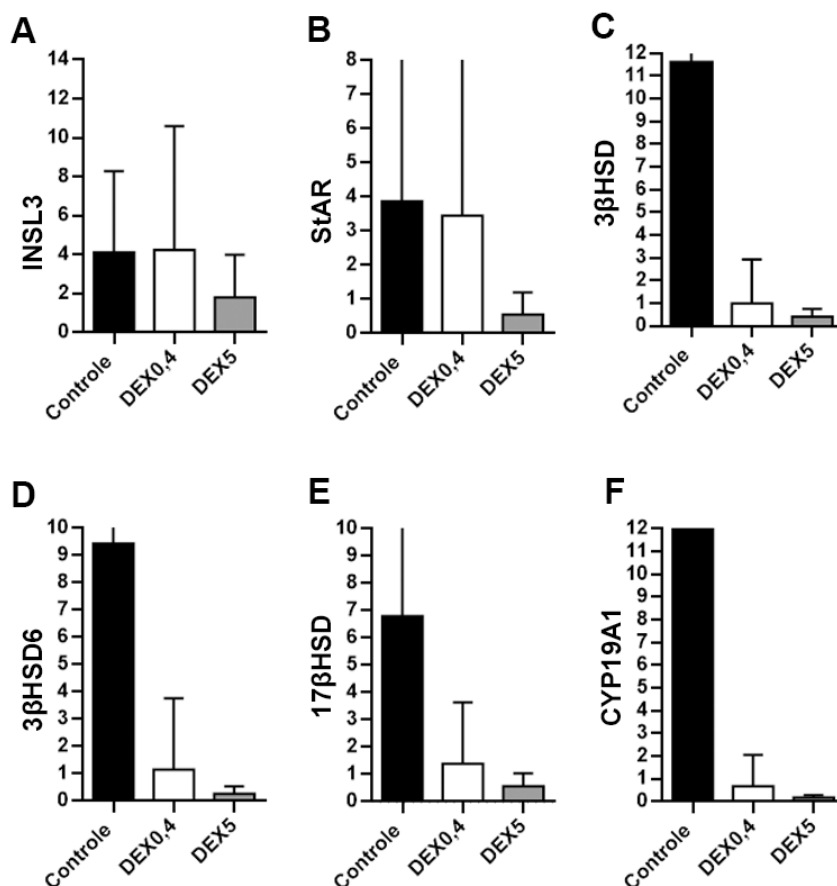




Figura 11: RT-PCR em camundongos adultos. Resultados da amplificação do DNA por PCR dos genes INSL3 (A), StAR (B), 3 $\beta$ HSD (C), mHSD3b6 (3 $\beta$ HSD6; D), 17 $\beta$ HSD (E) e Aromatase (CYP19A1; F). Barras na cor preta representam o grupo controle, cor branca representa o grupo DEX 0,4 e cor cinza representa o grupo DEX 5.

#### 4.5 Avaliação espermática

Não houve diferença nos parâmetros de integridade de membrana e motilidade dos espermatozoides entre os grupos. Aglutinação isolada esteve presente em pelo menos 66,6% dos animais analisados, no entanto o grupo controle e DEX 0,4 apresentaram aglutinação alta (16,7%) e moderada (12,5%) respectivamente. Ambos os grupos tratados com Dexametasona apresentaram uma maior concentração de espermatozoides em relação ao grupo sem manipulação (Tabela 7).

Tabela 7. Integridade de membrana, espermatozoides móveis progressivos e não progressivos, e porcentagem de animais apresentando algum grau de aglutinação (média  $\pm$  SEM).

		Controle	DEX 0.4	DEX 5
Integridade de membrana (%)		23.53 $\pm$ 3.81	25.06 $\pm$ 3.53	19.44 $\pm$ 3.47
Motilidade (%)	Progressiva	0.16 $\pm$ 0.1	0.06 $\pm$ 0.06	1.45 $\pm$ 0.7
	Não progressiva	23.5 $\pm$ 4.2	25.9 $\pm$ 2.9	17.6 $\pm$ 4.03
Aglutinação (%)	Nenhuma	16.7	0	0
	Isolada	66.6	87.5	100
	Moderada	0	12.5	0
	Alta	16.7	0	0

Nas análises morfológicas, o percentual de espermatozoides carregando algum tipo de defeito foi igual entre os grupos estudados. Porém, quando analisados separadamente, o percentual de espermatozoides com defeitos de cabeça diminuiu significativamente no grupo tratado com DEX 5. Quanto aos defeitos de peça intermediária e cauda, apenas a cauda dobrada apresentou um aumento significativo nos grupos manipulados (Tabela 8).

Tabela 8. Morfologia dos espermatozoides (média  $\pm$  SEM) em camundongos adultos (70 dias) expostos a diferentes doses de glicocorticoides e grupos controle.

Morfologia	Controle	DEX 0,4	DEX 5
Normal	27,29 $\pm$ 4,41	27,19 $\pm$ 2,78	28,34 $\pm$ 2,85
Anormal	72,71 $\pm$ 4,41	72,81 $\pm$ 2,78	71,66 $\pm$ 2,85
Defeitos de cabeça	27,73 $\pm$ 2,98 <sup>a</sup>	26,96 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	18,98 $\pm$ 1,33 <sup>b</sup>
Sem gancho	4,28 $\pm$ 1,25	2,33 $\pm$ 0,74	3,95 $\pm$ 0,57
Banana-like	2,48 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	0,25 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	0,39 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>
Mais fino	7,30 $\pm$ 1,16	9,65 $\pm$ 0,57	7,02 $\pm$ 0,84
Macrocéfalo	2,48 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	1,05 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup>	0,77 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>
Sem cabeça	2,67 $\pm$ 0,97	1,95 $\pm$ 0,35	2,39 $\pm$ 0,91
Amorfo	8,52 $\pm$ 0,73 <sup>ab</sup>	11,73 $\pm$ 1,58 <sup>b</sup>	4,46 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>
Duas cabeças	0,17 $\pm$ 0,17	0,41 $\pm$ 0,33	0,16 $\pm$ 0,08
Defeitos peça intermediária	16,36 $\pm$ 2,39	20,0 $\pm$ 1,89	22,73 $\pm$ 1,90
Somente a peça	1,07 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,81 $\pm$ 0,72 <sup>ab</sup>	5,78 $\pm$ 1,53 <sup>b</sup>
Mais grossa	3,21 $\pm$ 0,82	5,23 $\pm$ 1,34	8,73 $\pm$ 1,72
Mais fina	0,74 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0,11 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>
Inserção irregular	11,35 $\pm$ 1,87	12,96 $\pm$ 1,57	8,10 $\pm$ 2,05
Defeitos de cauda	28,45 $\pm$ 7,76	25,44 $\pm$ 1,80	29,80 $\pm$ 2,67
Duas caudas	0,08 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0	0,11 $\pm$ 0,07
Dobrada	6,72 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	17,14 $\pm$ 2,29 <sup>b</sup>	18,03 $\pm$ 1,16 <sup>b</sup>
Enrolada	2,55 $\pm$ 0,65	2,11 $\pm$ 0,40	2,83 $\pm$ 0,38
Agnesia de cauda	19,09 $\pm$ 8,24	6,19 $\pm$ 1,40	8,83 $\pm$ 2,11

Em relação a fragmentação do DNA, os espermatozoides dos animais expostos a maior dose de Dexametasona, apresentaram um aumento significativo na taxa de fragmentação quando comparados aos outros grupos analisados (Figura 12).

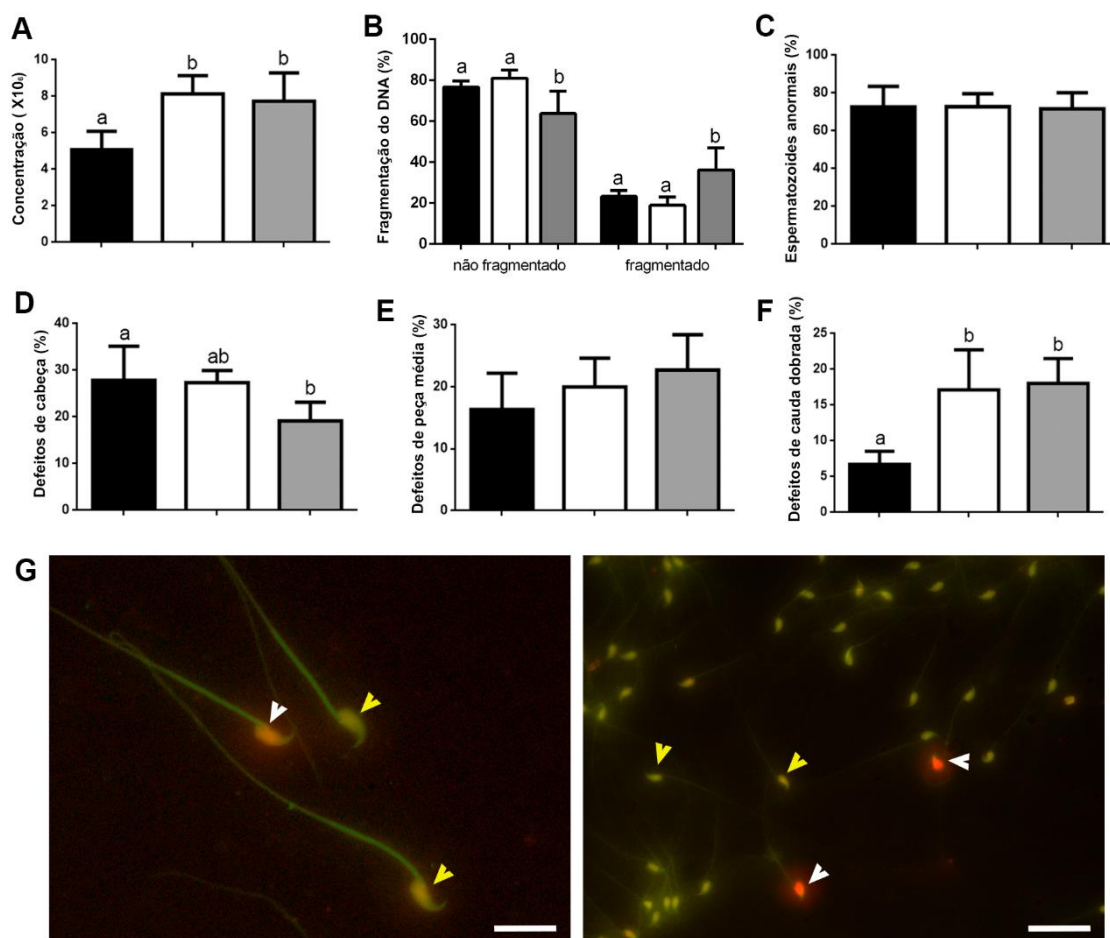


Figura 12: Análises espermáticas. Concentração dos espermatozoides (A), fragmentação do DNA (B), defeito total dos espermatozoides (C), defeitos de cabeça (D), peça intermediária (E) e cauda (F). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) Barras na cor preta representam o grupo controle, cor branca representa o grupo DEX 0,4 e cor cinza representa o grupo DEX 5. G: Micrografia representando a fragmentação do DNA dos espermatozoides através da coloração de Laranja de Acridina. Cabeça de seta branca indica espermatozoide com coloração vermelha classificados como fragmentados. Cabeça de seta amarela indica espermatozoide verdes com cromatina intacta. Aumento 400X e 200X.

## 5. DISCUSSÃO

Já é bem estabelecido que altos níveis de glicocorticoide, devido ao estresse, síndrome de Cushing ou tratamento com glicocorticoides sintéticos, podem afetar a fertilidade masculina por diversos mecanismos, como supressão da resposta testicular a gonadotropinas, indução da apoptose de células germinativas e indução do estresse oxidativo no epidídimo (Welsh et al., 1982; Orr & Mann, 1992; Yazawa et al., 2000; Gao et al., 2003.; Cooke, 2004; Hardy et al., 2005; Dhanabalan et al., 2013). Interessantemente, a deficiência a glicocorticoides, como na doença de Addison ou insuficiência adrenal crônica, também suprime a função testicular (Kowal, 2006). Esses dados sugerem que um certo nível da atividade de GC é necessária para a reprodução masculina normal. Portanto, investigar os efeitos da exposição pré-natal a glicocorticoides na regulação morfofuncional do testículo é essencial para entender o papel desses hormônios sob condições fisiológicas normais e as consequências da administração de GC sintéticos durante o período gestacional. No presente estudo, é possível implicar que eles causam alterações persistentes no testículo ao longo do desenvolvimento que vão ser melhor discutidos à frente.

Sabemos que diferentes eventos no início da vida podem influenciar o desenvolvimento e crescimento do feto, e alterar a atividade do eixo HPA (Levitt et al., 2000). Em concordância, no presente estudo, observamos um aumento do índice gonadossomático, que representa a relação entre peso corporal e testicular, dos neonatos tratados com a dose clínica de Dexametasona, e um aumento do índice anogenital do grupo DEX 5, indicando uma alteração no perfil hormonal na formação das características masculinas na fase pré-natal. Nos animais púberes, essas alterações se mantiveram, com aumento do peso corporal, peso testicular, índice gonadossomático, peso do epidídimo e do índice anogenital nos animais tratados com glicocorticoide. Assim como um aumento desses parâmetros nos animais adultos. Esses resultados indicam que essas alterações no desenvolvimento embrionário persistiram até a fase adulta, causando mudanças endócrinas a longo prazo.

A expressão dos receptores de glicocorticoides foi descrita em quase todos os tipos celulares testiculares, como células de Sertoli, espermatócitos, células peritubulares, células de Leydig, macrófagos, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e espermatozoides (Levy et al., 1989; Schulz et al., 1993; Weber et al., 2000). Hazra et al. (2014) mostrou que as ações mediadas pelos glicocorticoides nos testículos regulam a maturação e o número das células de Sertoli, aumentam a secreção de fluido para a formação do lúmen tubular e são importantes mediadores da esteroidogênese testicular. Além disso, parece ter um impacto no número de células germinativas. No presente estudo, avaliamos morfometricamente os mesmos componentes testiculares e verificamos que, em neonatos, a menor dose de Dexametasona resultou na diminuição do percentual de epitélio germinativo comparado a DEX 5 e no volume da tunica propria cordonal quando comparado ao grupo controle. Em contraste, todos os parâmetros analisados aumentaram nos grupos tratados dos animais púberes, com 35dpm, comparado ao controle. Nos adultos, surpreendentemente, o percentual de tunica propria e o volume de epitélio seminífero se restabeleceram ao padrão encontrado em neonatos e estavam menores no grupo DEX 0,4 comparado ao controle e DEX 5 respectivamente. Esses resultados estão em acordo com os dados encontrados para o número de células germinativas nos adultos, em que o grupo que recebeu a maior dose de Dexametasona apresentou um maior índice meiótico, menor índice apoptótico e maior produção espermática diária. Ainda, demonstramos que a exposição pré-natal aos glicocorticoides promove um avanço na espermatogênese nos indivíduos púberes, com o aparecimento de espermátides mais próximas à espermição do que no grupo controle com a mesma idade. Sabemos que o ambiente fetal é determinante para o fenótipo adulto e estudos conduzidos por Smith e Waddell (2000) também demonstraram que o aumento na exposição pré-natal à GC altera o tempo da puberdade. Além disso, esse período é crítico para a organização do eixo HPA para restabelecer a homeostase prejudicada pelos altos níveis de glicocorticoide, porém, esses efeitos organizacionais só estão completos após a puberdade (Moisan, 2021).

As células de Sertoli desempenham diversas funções essenciais para a espermatogênese, fornecendo nutrientes e suporte estrutural de sustentação para as células germinativas, e tem papel na maturação dessas células pela produção de

proteínas específicas e intermediação hormonal da espermatogênese (França & Russell, 1998; O'Donnell et al., 2000; Schulz et al., 2010). Por esses motivos, cada SC é capaz de suportar um número específico de células germinativas e, conseqüentemente, define a produção espermática do indivíduo (Hess & França 2007). No presente estudo, não houve diferença significativa na capacidade de suporte relativa e índice de célula de Sertoli entre os grupos analisados nas diferentes idades apesar da diferença em outros fatores celulares, repercutindo que este parâmetro espécie-específico é rigorosamente controlado a fim de garantir a função testicular. A puberdade determina o término da plasticidade da resposta celular frente aos desafios interpostos durante o período neonatal. Assim, homeostase testicular se estabelece de acordo com o arranjo alcançado.

A resposta observada ao tratamento com glicocorticoides no compartimento intersticial em neonatos indicou que, em geral, as alterações mais significativas estavam relacionadas com a maior dose de Dexametasona. Nesse sentido, a redução do volume líquido das células de Leydig estaria sugerindo um efeito inibitório sobre a proliferação ou mesmo na diferenciação dessas células. Corroborando essa hipótese, encontramos uma tendência a menor número de células de Leydig no grupo DEX 5 com menor volume citoplasmático e celular. Nesse contexto, o menor volume celular sugere que as células ainda se encontram em estágio imaturo de desenvolvimento.

Nos indivíduos expostos ao glicocorticoide durante a fase fetal e avaliados quando púberes e adultos, verificamos que as diferenças encontradas logo após o nascimento não estavam presentes, particularmente quanto à composição do interstício. Esta observação foi confirmada pelo volume líquido de compartimento intersticial e maior volume individual que as células esteroideogênicas atingiram nestes grupos. Nos camundongos existem duas populações distintas de LC, conhecidas como fetal (FLC) e adulta (ALC), que apresentam diferentes morfologias, regulação hormonal e esteroideogênese (Habert et al., 2001; Dong et al., 2007; Griswold & Behringer, 2009). A população FLC se diferencia e atua no testículo no período pré-natal enquanto a população ALC inicia a proliferação e diferenciação a partir de 3 dpn, em camundongos. Contudo, os precursores de células de Leydig da população adulta estão presentes no testículo desde o desenvolvimento fetal e aparece na sua forma diferenciada no testículo pré-pubere (Huhtaniemi & Pelliniemi, 1992; Wen, 2016; O'Donnell et al., 2017; Shima & Morohashi, 2017). Diante dos resultados até agora

obtidos podemos sugerir que durante a janela de exposição em 15,5 dpc a Dexametasona produz um desfecho inibitório na população fetal, sendo o principal alvo as células tronco e a linhagem precursora. Conforme demonstrado por Shima e colaboradores (2018), uma pequena subpopulação derivada da FLC podem dediferenciar ainda durante o estágio fetal e permanecerem nos testículos, agora transdiferenciada em precursoras de ALC. Esta subpopulação contribui, portanto, para o desenvolvimento da população de células de Leydig adultas em camundongos (Shima et al., 2018). Neste sentido, a tendência de menor volume de LC observada em neonatos no presente estudo estaria refletindo o efeito sobre a população de FLC que contribui com o número total de células de Leydig no adulto. Ainda, o maior volume celular reflete aumento nuclear e citoplasmático das células esteroidogênicas em púberes e adultos. É bem estabelecido na literatura que o componente citoplasmático das células de Leydig apresenta forte e positiva correlação com a síntese esteroidogênica. Isto se deve a maior quantidade de retículo endoplasmático liso associado a esse compartimento (Oliveira et al., 2020). Este fenômeno, relacionado a hipertrofia celular, corresponde a tentativa na recuperação do balanço esteroidogênico, frente a menor população celular.

A exposição pré-natal aos glicocorticoides leva a uma reprogramação do eixo HPA, sendo que um aumento nos níveis de GC gera uma redução na atividade de hipotalâmica-pituitária-adrenal, gerando impactos na vida do feto (Challis et al., 2000; Sloboda et al., 2005; Kapoor et al., 2008; Busada & Cidlowski, 2017). No presente estudo, apesar de não haver diferença significativa nas análises de volume e área da glândula adrenal, na avaliação qualitativa é possível perceber uma alteração clara na morfologia das células, com uma maior presença de vacúolos/ gotículas lipídicas na zona fasciculada dos animais tratados com glicocorticoide tanto com 35 quanto com 70 dpc. No sangue, os glicocorticoides circulam ligados a globulina ligadora de corticosteroide (CBG), que aumentam a meia-vida dos GCs no plasma e estimulando o crescimento e função da glândula adrenal, a fim de manter os níveis de corticosterona livre (Moisan, 2021). Portanto, essa alteração na arquitetura glandular, pode estar relacionada a uma alteração da função da adrenal estimulada pela maior exposição aos glicocorticoides.

Os glicocorticoides atuam por meio de seus receptores específicos (NR3C1), que pertencem a uma superfamília de receptores nucleares de esteroides e agem como

fator de transcrição dependente de ligante. Desse modo, os glicocorticoides regulam a expressão gênica (Zhang et al., 2019). O GC tem uma ação inibitória na esteroidogênese, diminuindo a produção de testosterona pelas células de Leydig, os níveis de FSH e LH e a regulação de estrogênio (Whirledge & Cidlowski, 2010; Hazra et al., 2014, Dagklis et al., 2015; Busada & Cidlowski, 2017; Zhang et al., 2019). A via esteroidogênica se inicia na mitocôndria da LC, em que o colesterol é translocado pela proteína StAR, e ocorrem sucessivas reações através das enzimas  $3\beta$ HSD e  $17\beta$ HSD (Ye et al., 2017) até a formação de testosterona, que é substrato para a formação de estrógenos através da ação da Aromatase (Carreau et al., 2011, 2012; Schulster et al., 2016). E INSL3 é um produto secretado pelas células de Leydig, considerado um biomarcador na sua capacidade funcional e participa da sobrevivência das células germinativas. Até o momento no presente estudo avaliamos os indivíduos adultos quanto a expressão gênica de proteínas chave da via esteroidogênica, contemplando a fase inicial (StAR), as etapas intermediárias ( $3\beta$ HSD e  $mHSD3B6$ ), os eventos finais ( $17\beta$ HSD e Aromatase) e reguladores (INSL3) deste processo. Assim, verificamos uma diminuição dos níveis relativos de mRNA de todos os parâmetros avaliados no grupo DEX 5, indicando que ele parece exercer um papel inibitório da expressão de genes relacionados com a via esteroidogênica nos testículos. Esses dados são consistentes com dados descritos na literatura em que a exposição a glicocorticoides leva a diminuição na produção de testosterona e prejudica a expressão e função de enzimas esteroidogênicas (Yazawa et al., 2000; Whirledge, 2010; Hampl & Stárka, 2020).

Em relação aos parâmetros espermáticos, observamos que a exposição pré-natal à Dexametasona não resultou em diferenças na integridade de membrana ou motilidade dos espermatozoides. No entanto, o efeito estimulatório de GC em parâmetros testiculares já descritos anteriormente, resultaram em uma maior concentração espermática nos grupos tratados. Borges et al., 2017 mostraram uma baixa fertilidade após inseminação artificial em ratos expostos a Betametasona no período pré-natal, que assim como a Dexametasona, também é usado como terapia para mulheres em risco de parto prematuro, indicando que apesar do aumento na concentração, os espermatozoides são menos viáveis para fecundação. É bem estabelecido na literatura que a exposição a glicocorticoides endógenos ou exógenos podem levar a um aumento do estresse oxidativo no testículo e epidídimo (Whirledge & Cidlowski,



2013). No presente estudo, observamos que a distribuição de espermatozoides normais e anormais foi semelhante entre os grupos. Entretanto, o defeito tipo “cauda dobrada” foi mais frequentemente observado nos grupos tratados. Além disso, a maior taxa de espermatozoides positivos na avaliação da fragmentação de DNA foi observada no grupo tratado com a maior dose de Dexametasona, explicado pela diminuição do índice apoptótico nesse grupo, que sugere um menor reparo em células defeituosas que seriam descartadas e reabsorvidas. Este resultado indica que estes gametas apresentam grande chance de falha no evento de fertilização. De maneira interessante, neste grupo foi computada a menor frequência de defeitos morfológicos ligados à cabeça do espermatozoide. Tomados juntos, esses resultados sugerem que a qualidade espermática e capacidade de fertilização são afetados pela exposição pré-natal dos fetos machos aos níveis aumentados de glicocorticoides.

## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados aqui apresentados exploram importantes alterações testiculares e parâmetros espermáticos após a exposição a glicocorticoides *in utero* e tem importantes implicações no tratamento pré-natal em humanos. GC tem um importante papel regulatório na função testicular e, até o momento, mostramos que a exposição do feto, principalmente a uma sobredose de glicocorticoides, pode induzir alterações permanentes na fertilidade a longo prazo em camundongos. Assim, conseguimos entender melhor as funções e formas de atuação dos glicocorticoides no testículo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade S.E., Gurwitz J.H., Davis R.L., et al. (2004). Prescription drug use in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 191(2):398–407.
- Ariyaratne H.B.S., Mendis-Handagama, S.M.L.C. (2000). Changes in the testis interstitium of sprague dawley rats from birth to sexual maturity. *Biology of Reproduction*, 62, 680–690
- Atanassova N.N., Walker M., Mckinnell C., Fisher J.S., Sharpe R.M. (2005). Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *J Endocrinol* 184, 107–11.
- Avelar G. F., Oliveira C. F. A., Soares J. M., Silva I. J., Dobrinski I., Hess R. A., & França, L. R. (2010). Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: A non-random event. *Theriogenology*, 74, 11–23.
- Berger I., Werdermann M., Bornstein S.R., Steenblock C. (2019). The adrenal gland in stress - Adaptation on a cellular level. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 190:198-206.
- Bhattacharya I., Dey S. (2023). Emerging concepts on Leydig cell development in fetal and adult testis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 13:1086276.
- Borges C.S., Dias A.F.M.G, Silva P., Rosa J.L., Guerra M.T., Silva R.F., Kiguti L.R.A., Pupo A.S., Kempinas W.G. (2017). Long-term adverse effects on reproductive function in male rats exposed prenatally to the glucocorticoid betamethasone. *Toxicology*. 376 15-22
- Breen K.M., Mellon P.L. (2014). Influence of stress-induced intermediates on gonadotropin gene expression in gonadotrope cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 385:71–77
- Briski K.P., Sylvester P.W. (1991) Acute inhibition of pituitary LH release in the male rat by the glucocorticoid agonist decadron phosphate. *Neuroendocrinology*. 54(4):313–20.
- Busada J.T., Cidlowski J. A. (2017). Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development. *Current Topics in Developmental Biology*, Volume 125. Chapter Five
- Capel, B. (2000). The battle of the sexes. *Mechanisms of development*, v. 92, n. 1, p. 89–103.
- Carbone R.L, Zuloaga D.G, Lacagnina A. F., McGivern R.F, Handa R. J. (2012). Exposure to dexamethasone during late gestation causes female-specific decreases in core body temperature and prepro-thyrotropin-releasing hormone expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Physiology & Behavior* 108 6-12
- Carreau S., Bouraima-Lelong H., Delalande C. (2012). Role of estrogens in spermatogenesis. *Frontiers in Bioscience*, 4, 1–11.
- Castellano J.M., Tena-Sempere M. (2016). Animal Modeling of Early Programming and Disruption of Pubertal Maturation. *Endocr Dev*;29:87-121.
- Challis J., Sloboda D., Matthews S. (2000). Fetal hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) development and activation as a determinant of the timing of birth, and of postnatal disease. *Endocr Res.* 26:489–504.
- Chen H., Ge R.S., Zirkin, B.R. (2009). Leydig cells: from stem cells to aging. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 306(1–2), 9–16.

Cheung K.H., Leung G.P., Leung M.C., Shum W.W., Zhou W.L., Wong P.Y. (2005). Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. *J Gen Physiol.* 125:443-54

Clavijo R.I., Hsiao W. (2018). Update on male reproductive endocrinology. *Transl Androl Urol.*7(suppl 3): S367-S372.

Cooke P.S., Holsberger D.R., Witorsch R.J., Sylvester P.W., Meredith J.M., Treinen K.A., Chapin R.E. (2004). Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 194, 309–335.

Cornwall G.A. (2009) New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update.* 15:213–27.

Crowther C.A., Doyle L.W., Haslam R.R., Hiller J.E., Harding J.E., Robinson J.S. (2007). Outcomes at 2 years of age after repeat doses of antenatal corticosteroids. *N Engl J Med.* 357(12):1179-89.

Dacheux J.L., Castella S., Gatti J.L., Dacheux F. (2005). Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology.* 63:319-41.

Dagklis T., Ravanos K., Makedou K., Kourtis A., Rousso D. (2015). Common features and differences of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male and female. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology.* 31:14–17.

De Gendt K., Atanassova N., Tan K.A.L., França L.R., Parreira G.G., McKinnell C., Sharpe R.M., Saunders P.T.K., Mason J.I., Hartung S., Ivell R., Denolet E., Verhoeven G. (2005). Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. *Endocrinology,* 146(9), 4117– 4126.

de Oliveira C.F.A., Lara N.L.E.M., Cardoso B.R.L., de França L.R., de Avelar G.F. (2020). Comparative testis structure and function in three representative mice strains. *Cell Tissue Res.* 382(2):391-404 Erratum in: *Cell Tissue Res.* 2021 Feb;383(2):907-910. PMID: 32666138.

De Rooij D.G., Russell L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 21(6):776-98.

DeFalco T., Takahashi S., Capel B. (2011). Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Developmental Biology,* 352(1), 14–26.

Dhanabalan S., Mathur P.P., Latha P. (2013). TCDD and corticosterone on testicular steroidogenesis and antioxidant system of epididymal sperm in rats. *Toxicol Ind Health,* 1 –12

Dhayat N.A., Dick B., Frey B.M., d'Uscio C.H., Vogt B., Flück C.E. (2017). Androgen biosynthesis during minipuberty favors the backdoor pathway over the classic pathway: Insights into enzyme activities and steroid fluxes in healthy infants during the first year of life from the urinary steroid metabolome. *J Steroid Biochem Mol Biol.*165(Pt B):312-322.

Dong L., Jelinsky S.A., Finger J.N., Johnston D.S., Kopf G.S., Sottas C.M., Hardy M.P. and Ge R.-S. (2007). Gene expression during development of fetal and adult Leydig cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*1120, 16-35.

- Endo T., Mikedis M.M., Nicholls P.K., Page D.C., de Rooij D.G. (2019). Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules*. 9(12):775.
- Fawcett D.W. (1994) In: *A Textbook of Histology*, 12th Ed. Chaoman & Hall, New York.
- Fitzsimons R., Greenberger P.A., Patterson R. (1986). Outcome of pregnancy in women requiring corticosteroids for severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 78(2):349-53.
- Fowden A. L., Li J., Forhead A. J. (1998). Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? *Proc. Nutr. Soc.* 57, 113–122.
- França L. R., Auharek S. A., Hess R. A., Dufour J. M., Hinton B. T. (2012). Blood-tissue barriers: Morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and bloodepididymal barriers. In C. Y. Cheng (Ed.), *Biology and regulation of blood tissue barriers* (1st edn., pp. 237–259). New York: Landes Bioscience and Springer Science.
- França L. R., Chiarini-Garcia H. (2005) 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.; Russell L. D. (1998). The testis of domestic animals. In: F. Martinez; J. Regadera (Eds.); *Male Reproduction: a multidisciplinary overview*. p.197–219.
- França L.R., Godinho C.L. (2003). Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod* 68, 1554–1561.
- França L.R., Hess R.A., Cooke P.S., Russell L.D. (1995). Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anatomical Record*, v.242, n. 1, p.57-69.
- França L.R., Silva V.A., Chiarini-Garcia H., Garcia S.K., Debeljuk, L. (2000). Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of reproduction*, v. 63, n. 6, p. 1629–36.
- Gao H.B, Tong M.H, Hu Y.Q, You H.Y, Guo Q.S, Ge R.S, Hardy M.P. (2003). Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 199, 153–163
- Garza S., Papadopoulos V. (2023). Testosterone recovery therapy targeting dysfunctional Leydig cells. *Andrology*. 11(5):816-825.
- Griswold S.L., Behringer, R.R. (2009). Fetal Leydig cell origin and development. *Sexual Development*, 3(1), 1–15.
- Guan X., Chen F., Chen P., Zhao X., Mei H., Liu J., Lian Q., Zirkin B.R., Chen H. (2019). Effects of spermatogenic cycle on Stem Leydig cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Endocrinol*. 5;481:35-43.
- Habert R., Lejeune H., Saez J. M. (2001). Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol*. 179, 47-74.
- HAMPL R., Stárka L. (2020). Glucocorticoids affect male testicular steroidogenesis. *Physiol Res*. 69(Suppl 2): S205-S210.
- Hardy M.P., Gao H.B., Dong Q., Ge R., Wang Q., Chai W.R., Feng X., Sottas C. (2005) Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res* 322, 147–153.

- Hazra R., Jimenez M., Desai R., Handelsman D.J., Allan C.M. (2013). Sertoli cell androgen receptor expression regulates temporal fetal and adult Leydig cell differentiation, function, and population size. *Endocrinology*, 154(9), 3410–22.
- Hazra R., Upton D., Jimenez M., Desai R., Handelsman D.J., Allan C.M. (2014). In vivo actions of the sertoli cell glucocorticoid receptor. *Endocrinology*. 155(3):1120–1130
- Hermo L., Chong D.L., Moffatt P., Sly W.S., Waheed A., Smith C.E. (2005). Region and cell specific differences in the distribution of carbonic anhydrases II, III, XII, and XIV in the adult rat epididymis. *J Histochem Cytochem*. 53:699-713.
- Hess R.A., França L.R. (2007). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: C. Y. Cheng (Ed.); *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. v. 636, p.1–15, Springer New York.
- Hinton, B. T., Setchell. B. P. (1993). Fluid secretion and movement. In *The Sertoli Cell* (L. D. Russell and M. D. Grosword, Eds.), pp. 249–267
- Holstein A. F., Schulze W., Davidoff M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 1, 107
- Huang S., Ye L., Chen H. (2017). Sex determination and maintenance: the role of DMRT1 and FOXL2. *Asian J Androl*. Nov-Dec;19(6):619-624.
- Huhtaniemi, I.; Pelliniemi, L.J. (1992). Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *P. S. E. B. M.*, 201:125-140
- Joseph A., Shur B.D., Hess R.A. (2011). Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biology of Reproduction*, 84(2), 207–17.
- Kamel F., Kubajak C.L. (1987). Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonadal steroids and mechanism of action. *Endocrinology*. 121(2):561–8.
- Kapoor A., Petropoulos S., Matthews S. G. (2008). Fetal programming of hypothalamic–pituitary– adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res. Rev*. 57, 586–595.
- Kaufmann, S.H., Wright, W.W., Okret, S., Wikstrom, A.CH. Gustafsson, J.A., Shaper, N.L. and Shaper, J.H. (1992). Evidence that rodent epididymal sperm contain the Mr approximately 94,000 glucocorticoid receptor but lack the Mr approximately 90,000 heat shock protein. *Endocrinology* 130, 3074-3084.
- Kerr J.B., Knell C.M. (1988). The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development*, 103, 535–544.
- Kim J.H., Choi M.H. (2020). Embryonic Development and Adult Regeneration of the Adrenal Gland. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 35(4):765-773.
- Koch S., Acebron S.P., Herbst J., Hatiboglu G., Niehrs C. (2015). Posttranscriptional Wnt signaling governs epididymal sperm maturation. *Cell*. 163:1225–36.
- Kowal B.F., Turco J., Nangia A.K. (2006). Addison's disease presenting as male infertility. *Fertility and sterility*. 85:1059, e1051–1054

- Kumar D., DeFalco T. (2018). A perivascular niche for multipotent progenitors in the fetal testis. *Nat Commun* 9(1):4519.
- Lara, N. L. M., Costa, G. M. J., Avelar, G. F., Lacerda, S. M. S. N., Hess, R. A., & França, L. R. (2018). Testis physiology-overview and histology. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 105-116). Elsevier
- Lara, N.d. L.e. M., Avelar, G. F.d., Costa, G. M. J., Lacerda, S. M.d. S. N., Hess, R. A., & França, L. R.d. (2018). Cell–Cell Interactions—Structural. In M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. vol. 1, pp. 68–75. Academic Press: Elsevier.
- Lawrence B.M., O'Donnell L., Smith L.B., Rebourcet D. (2022). New Insights into Testosterone Biosynthesis: Novel Observations from HSD17B3 Deficient Mice. *Int J Mol Sci*. 23(24):15555.
- Leung G.P., Cheung K.H., Leung C.T., Tsang M.W., Wong P.Y. (2004). Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol Cell Endocrinol*. 216:5-13.
- Levine S. (1957) Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science*, 126, p. 405
- Levitt N.S., Lambert E.V., Woods D., Hales C.N., Andrew R., Seckl J.R. (2000) Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young South African adults: early programming of cortisol axis. *J Clin Endocrinol Metab*. 85:4611–4618.
- Levy F.O., Ree A.H., Eikvar L., Govindan M.V., Jahnsen T., Hansson V. (1989). Glucocorticoid receptors and glucocorticoid effects in rat Sertoli cells. *Endocrinology*. 124:430–436.
- Lin Y.T., Capel B. (2015). Cell fate commitment during mammalian sex determination. *Curr Opin Genet Dev*. 32:144-52.
- Liu J., Rone M.B., Papadopoulos V. (2006). Protein–protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *JBiol*
- Mahendroo, M.;Wilson, J.D.; Richardson, J.A.; Auchus, R.J. (2004). Steroid 5alpha-reductase 1 promotes 5alpha-androstane-3alpha,17betadiol synthesis in immature mouse testes by two pathways. *Mol. Cell Endocrinol*. 222, 113–120.
- Mäkelä J.A., Koskenniemi J.J, Virtanen H.E, Toppari J. (2019). Testis Development, *Endocrine Reviews*, Volume 40, Issue 4, Pages 857–905
- Manna P.R., Dyson M.T., Stocco D.M. (2009). Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Molecular Human Reproduction*, 15(6), 321–33.
- McCarrey J.R. (2013). Toward a more precise and informative nomenclature describing fetal and neonatal male germ cells in rodents. *Biol Reprod*. 89(2):47
- McKinnell C., Sharpe R.M., Mahood K., Hallmark N., Scott H., Ivell R., Staub C., Jégou B., Haag F., Koch-Nolte F., Hartung S. (2005). Expression of insulin-like factor 3 protein in the rat testis during fetal and postnatal development and in relation to cryptorchidism induced by in utero exposure to Di-(n-Butyl)-phthalate. *Endocrinology*, 146(10), 4536–4544.

- Mendis-Handagama S.M., Ariyaratne H.B. (2001). Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of Reproduction*, 65(3), 660–671.
- Menezes C.M.C. (2006). Análise morfofuncional da espermatogênese de queixadas (*Tayassu pecari*), Programa de Pós-graduação em Produção Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agrupercuárias, RJ, 96p.
- Mesiano S., Jaffe R.B. (1997). Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 18:378–403.
- Miyabayashi K., Shima Y., Inoue M., Sato T., Baba T., Ohkawa Y., Suyama M., Morohashi K.I. (2017). Alterations in fetal Leydig cell gene expression during fetal and adult development. *Sex Dev*;11(2):53–63.
- Moisan M.P. (2021). Sexual Dimorphism in Glucocorticoid Stress Response. *Int J Mol Sci.* 22(6):3139
- Morohashi K., Zubair M. (2011). The fetal and adult adrenal cortex, *Mol. Cell. Endocrinol.* 336 193–197.
- Newnham J.P., Jobe A.H. (2009) Should we be prescribing repeated courses of antenatal corticosteroids? *Semin Fetal Neonatal Med.*14:157–163.
- Nussdorfer G.G., (1980). Cytophysiology of the adrenal zona glomerulosa, *Int. Rev. Cytol.* 64 307–368.
- O'Donnell L., Stanton P.G., Bartles J.R., Robertson D.M. (2000). Sertoli cell ectoplasmic specializations in the seminiferous epithelium of the testosterone-suppressed adult rat. *Biol. Reprod.*, 63: 99-108,
- O'Donnell L., Stanton P., de Kretser D.M. (2017). Endocrinology of the male reproductive system and spermatogenesis. *Endotext.* MDText.com, Inc.
- Orr T.E., Mann D.R. (1992). Role of glucocorticoids in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats. *Horm Behav* 26, 350–363.
- Orth J.M. (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *The Anatomical record*, v. 203, n. 4, p. 485–92.
- Papadopoulos V., Zirkin B.R. (2021). Leydig cell aging: molecular mechanisms and treatments. *Vitam Horm.*115:585-609.
- Perić H.M., Takahashi M., Ježek D., Cunha G.R. (2023). Early development of the human embryonic testis. *Differentiation.* Jan-Feb;129:4-16.
- Pignatti E., Leng S., Carlone D.L., Breault D.T. (2017). Regulation of zonation and homeostasis in the adrenal cortex, *Mol. Cell. Endocrinol.* 441 146–155.
- Plotsky, P.M., Thrivikraman, K.V., Meaney M.J. (1993). Central and feedback regulation of hypothalamic corticotropin-releasing factor secretion. *Ciba Found. Symp.* 172, 59-75.
- Potter S.J., Kumar D.L., DeFalco T. (2016). Origin and differentiation of androgen-producing cells in the gonads. In: Piprek R. (Ed.) *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development. Results and Problems in Cell Differentiation*, 58, 101-135. Springer, Cham.



- Pui H.P., Saga Y. (2017). Gonocytes-to-spermatogonia transition initiates prior to birth in murine testes and it requires FGF signaling. *Mech Dev.* 144(Pt B):125-139.
- Rebourcet D., Darbey A., Monteiro A., Soffientini U., Tsai Y.T., Handel I., Pitetti, J.L., Nef S., Smith L.B., O'Shaughnessy P.J. (2017). Sertoli cell number defines and predicts germ and Leydig cell population sizes in the adult mouse testis. *Endocrinology*, 158, 2955–2969.
- Rebourcet D., Mackay R., Darbey A., Curley M.K., Jørgensen A., Frederiksen H., Mitchell R.T., O'Shaughnessy P.J., Nef S., Smith L.B. (2020). Ablation of the canonical testosterone production pathway via knockout of the steroidogenic enzyme HSD17B3, reveals a novel mechanism of testicular testosterone production. *FASEB J.* 34, 10373–10386.
- Rebourcet D., O'Shaughnessy P.J., Monteiro A., Milne L., Cruickshanks L., Jeffrey N., Guillou F., Freeman T.C., Mitchell R.T., Smith L. B. (2014). Sertoli cells maintain Leydig cell number and peritubular myoid cell activity in the adult mouse testis. *PloS One*, 9(8), e105687.
- Rijntjes E., Swarts H.J.M., Anand-Ivell R., Teerds K. J. (2009). Prenatal induced chronic dietary hypothyroidism delays but does not block adult-type Leydig cell development. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 296(2), e305–e314.
- Robaire B., Hermo L. (1988). Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions and their regulation. Knobil E, Neill J, editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press.
- Roberts D., Dalziel S. (2006). Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Db Syst Rev.* 3: CD004454.
- Ross I.L., Louw G.J. (2015). Embryological and molecular development of the adrenal glands. *Clin Anat.* 28:235–42.
- Rotgers E., Jørgensen A., Yao H.H. (2018). At the Crossroads of Fate-Somatic Cell Lineage Specification in the Fetal Gonad. *Endocr Rev.* Oct 1;39(5):739-759.
- Russell L. D., Ettlin R. A., Sinha Hikim A. P., Clegg, E. D. (1990). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater, FL: Cache River Press.
- Schulster M., Bernie A. M., Ramasamy R. (2016). The role of estradiol in male reproductive function. *Asian Journal of Andrology*, 18(3), 435–40.
- Schultz R., Isola J., Parvinen M., Honkaniemi J., Wikström A.C., Gustafsson J.A., Peltto-Huikko M. (1993). Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Mol Cell Endocrinol.* 95:115–120.
- Schulz R.W., França L.R., Lareyre J.J., Le Gac F., Chiarini-Garcia H., Nobrega R.H., Miura T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, v. 165, n. 3, p. 390–411.
- Scott H.M., Hutchison G.H., Jobling M.S., Mckinnell C., Drake A.J., Sharpe R.M. (2008). Relationship between androgen action in the 'male programming window', fetal Sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology* 149, 5280–5287.
- Serre V., Robaire B. (1998) Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. *Biol Reprod.* 58:497- 513.

- Setchell B. P. (1998). The Parkes Lectures. Heat and the testis. *J Reprod Fertil.* 114(2):179-94
- Setchell B.P. (1980). The Functional significance of the Blood-testis Barrier. *J. Androl.*, 1: 3-10.
- Sharpe R.M. (2020). Androgens and the masculinization programming window: human-rodent differences. *Biochemical Society Transactions* 48 1725–1735
- Shaw, G.; Fenelon, J.; Sichlau, M.; Auchus, R.J.; Wilson, J.D.; Renfree, M.B. (2006). Role of the alternate pathway of dihydrotestosterone formation in virilization of the Wolffian ducts of the tamar wallaby, *Macropus eugenii*. *Endocrinology*, 147, 2368–2373.
- She Z.Y., Yang W.X. (2017). Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development? *Semin Cell Dev Biol.* Mar;63:13-22.
- Shen Y., Zhang F., Li F., Jiang X., Yang Y., Li X., Li W., Wang X., Cheng J., Liu M., Zhang X., Yuan G., Pei X., Cai K., Hu F., Sun J., Yan L., Tang L., Jiang C., Tu W., Xu J., Wu H., Kong W., Li S., Wang K., Sheng K., Zhao X., Yue H., Yang X., Xu W. (2019). Loss-of-function mutations in *QRICH2* cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Nature communications*, 10(1), 433.
- Shima Y., Matsuzaki S., Miyabayashi K., Otake H., Baba T., Kato S., Huhtaniemi I., Morohashi K.I. (2015). Fetal Leydig cells persist as an androgen-independent subpopulation in the postnatal testis. *Molecular Endocrinology*, 29, 1581–93.
- Shima Y., Miyabayashi K., Sato T., Suyama M., Ohkawa Y., Doi M., Okamura H., Suzuki K. (2018). Fetal Leydig cells dedifferentiate and serve as adult Leydig stem cells. *Development.* Dec 5;145(23):dev169136.
- Shima Y., Morohashi K.I. (2017). Leydig progenitor cells in fetal testis. *Mol Cell Endocrinol* 15:445:55–64.
- Sipilä P.; Junnila A., Hakkarainen J., Huhtaniemi R., Mairinoja L., Zhang F.P., Strauss L., Ohlsson C., Kotaja N., Huhtaniemi I., et al. (2020). The lack of *HSD17B3* in male mice results in disturbed Leydig cell maturation and endocrine imbalance akin to humans with *HSD17B3* deficiency. *FASEB J.* 34, 6111–6128.
- Sloboda D.M., Challis J.R., Moss T.J., Newnham J.P. (2005). Synthetic glucocorticoids: antenatal administration and long-term implications. *Curr Pharm Des.* 11:1459–1472.
- Smith J.T., Waddell B.J. (2000). Increased fetal glucocorticoid exposure delays puberty onset in postnatal life. *Endocrinology.* 141(7):2422-8.
- Sullivan R., Frenette G., Girouard J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian journal of andrology*, v. 9, n. 4, p. 483–91.
- Sullivan R., Saez F., Girouard J., Frenette G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cell Mol Dis.* 35:1–10.
- Svechnikov K., Landreh L., Weisser J., Izzo G., Colón E., Svechnikova I., Söder O. (2010). Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr.* 73(2):93–101.

- Svingen T., Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes & Development*, 27(22), 2409–26.
- Verhoeven G., Willems A., Denolet E., Swinnen J.V., De Gendt K. (2010). Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1537–56.
- Vernet P., Aitken R.J., Drevet J.R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol.* 216:31-9
- Vieira C.P, Lara N.L.M, Avelar G.F. (2019). Optimization of spermatozoa analysis in mice. (in preparation).
- Waites G.M. (1991). Thermoregulation of the scrotum and testis: studies in animals and significance for man. *Adv Exp Med Biol* ;286:9-17.
- Weber M.A., Groos S., Hoßpfl U., Spielmann M., Aumuüller G., Konrad L. (2000). Glucocorticoid receptor distribution in rat testis during postnatal development and effects of dexamethasone on immature peritubular cells in vitro. *Andrologia.* 32:23–30.
- Wei R., Zhong S., Qiao L., Guo M., Sha, M., Wang S., Jiang B., Yang Y., Gu C. (2020). Steroid 5-Reductase Type I Induces Cell Viability and Migration via Nuclear Factor- $\kappa$ B/Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathway in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* 10, 1501.
- Welsh M., Saunders P.T.K., Fiskin M., Scott H.M., Hutchison G.R., Smith L.B., Sharpe R.M. (2008). Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1479–1490.
- Welsh T.H. Jr, Bambino T.H., Hsueh A.J. (1982). Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. *Biol Reprod* 27, 1138–1146.
- Wen Q., Cheng C.Y., Liu Y.-X. (2016). Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, 89–98.
- Whirledge S., Cidlowski J.A. (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinol.* 35:109–125.
- Whirledge S., Cidlowski J.A. (2013). A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology.* 154:4450–4468.
- World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Geneva, WHO press, 2010, 287 p.
- Yates R., Katugampola H., Cavlan D., Cogger K., Meimaridou E., Hughes C, et al. (2013). Adrenocortical development, maintenance, and disease. *Curr Top Dev Biol.* 106:239–312.
- Yazawa H., Sasagawa I., Nakada T. (2000) Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Hum Reprod* 15, 1917–1920.
- Ye L., Li X., Li L., Chen H., Ge R.S. (2017). Insights into the development of the adult Leydig cell lineage from stem Leydig cells. *Frontiers in Physiology*, 8, 430.

Yoshida S. (2020). Mouse Spermatogenesis Reflects the Unity and Diversity of Tissue Stem Cell Niche Systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 12(12): a036186.

Zenick H., Clegg E.D., Perreault S.D., Klinefelter G.R., Gray L.E. (1994). *Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. Principles and methods of toxicology.* New York: Raven Press.

Zhang J., Hu G., Huang B., Zhuo D., Xu Y., Li H., Zhan X., Ge R.S., Xu Y. (2019) Dexamethasone suppresses the differentiation of stem Leydig cells in rats in vitro. *BMC Pharmacol Toxicol.* 20(1):32

## 8. ANEXOS

### 8.1. Artigos publicados em colaboração

1. Figueiredo AFA, Wnuk NT, **Vieira CP**, Gonçalves MFF, Brener MRG, Diniz AB, Antunes MM, Castro-Oliveira HM, Menezes GB, Costa GMJ. Activation of C-C motif chemokine receptor 2 modulates testicular macrophages number, steroidogenesis, and spermatogenesis progression. *Cell Tissue Res.* 2021 Oct;386(1):173-190. doi: 10.1007/s00441-021-03504-w. Epub 2021 Jul 23. PMID: 34296344.

Cell and Tissue Research  
<https://doi.org/10.1007/s00441-021-03504-w>

REGULAR ARTICLE



### Activation of C–C motif chemokine receptor 2 modulates testicular macrophages number, steroidogenesis, and spermatogenesis progression

A. F. A. Figueiredo<sup>1</sup> · N. T. Wnuk<sup>1</sup> · C. P. Vieira<sup>1</sup> · M. F. F. Gonçalves<sup>1</sup> · M. R. G. Brener<sup>1</sup> · A. B. Diniz<sup>2</sup> · M. M. Antunes<sup>2</sup> · H. M. Castro-Oliveira<sup>2</sup> · G. B. Menezes<sup>2</sup> · G. M. J. Costa<sup>1</sup>

Received: 17 September 2020 / Accepted: 2 July 2021  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

#### Abstract

The monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) belongs to the CC chemokine family and acts in the recruitment of C–C motif chemokine receptor 2 (CCR2)-positive immune cell types to inflammation sites. In testis, the MCP-1/CCR2 axis has been associated with the macrophage population's functional regulation, which presents significant functions supporting germ cell development. In this context, herein, we aimed to investigate the role of the chemokine receptor CCR2 in mice testicular environment and its impact on male sperm production. Using adult transgenic mice strain that had the CCR2 gene replaced by a red fluorescent protein gene, we showed a stage-dependent expression of CCR2 in type B spermatogonia and early primary spermatocytes. Several parameters related to sperm production were reduced in the absence of CCR2 protein, such as Sertoli cell efficiency, meiotic index, and overall yield of spermatogenesis. Daily sperm production decreased by almost 40%, and several damages in the seminiferous tubules were observed. Significant reduction in the expression of important genes related to the Sertoli cell function (Cnx43, Vim, Ocln, Spna2) and meiosis initiation (Stra8, Pcna, Prdm9, Msh5) occurred in comparison to controls. Also, the number of macrophages significantly decreased in the absence of CCR2 protein, along with a disturbance in Leydig cell steroidogenic activity. In summary, our results show that the non-activation of the MCP-1/CCR2 axis disturbs the testicular homeostasis, interfering in macrophage population, meiosis initiation, blood–testis barrier function, and androgen synthesis, leading to the malfunction of seminiferous tubules, decreased testosterone levels, defective sperm production, and lower fertility index.

**Keywords** CCR2 · Macrophage · Meiosis · Sertoli cell · Leydig cell · Androgen

2. Farias TO, Figueiredo AFA, Wnuk NT, **Vieira CP**, Lara NLEM, Avelar GF, Talamoni SA, Costa GMJ. Sperm production and seminal analyses in a Neotropical sperm-storing vespertilionid bat yellowish myotis (*Myotis levis*). *Theriogenology*. 2021 Oct 15;174:73-84. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.08.018. Epub 2021 Aug 15. PMID: 34425303.

Theriogenology 174 (2021) 73–84



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: [www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)



## Sperm production and seminal analyses in a Neotropical sperm-storing vespertilionid bat yellowish myotis (*Myotis levis*)



Talita De Oliveira Farias<sup>a</sup>, André Felipe Almeida Figueiredo<sup>a</sup>, Natalia Teixeira Wnuk<sup>a</sup>, Carolina Pinhol Vieira<sup>a</sup>, Nathalia de Lima e Martins Lara<sup>a</sup>, Gleide Fernandes de Avelar<sup>a</sup>, Sônia Aparecida Talamoni<sup>b</sup>, Guilherme Mattos Jardim Costa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Cellular Biology, Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Mastozoology, Department of Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Minas Gerais - PUC Minas, Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 13 April 2021  
Received in revised form  
3 August 2021  
Accepted 13 August 2021  
Available online 15 August 2021

**Keywords:**  
Chiroptera  
Seasonal reproduction  
Spermatogenesis duration  
Sperm production  
Seminal parameters

### ABSTRACT

Yellowish myotis is a Neotropical vespertilionid bat that presents a seasonal reproduction. The sperm is produced in the Mature stage, stored in the Regressed stage and released in the Rest stage (mating period). Aiming to understand, for the first time, the relationship between testis and epididymis physiology in yellowish myotis reproduction, the spermatogenesis length, sperm production, and seminal parameters were herein evaluated. Fifty-one adult male bats were captured in Santuário do Caraça, Minas Gerais, Brazil. The gonads were collected in the Maturing and Mature stages for histomorphometric and immunohistochemical analyses, whereas the epididymis was evaluated in all reproductive stages for seminal studies. Our results demonstrated that the yellowish myotis spermatogenic process is fast, lasting  $31.70 \pm 0.15$  days. Despite the low Sertoli cell efficiency ( $6.60 \pm 1.23$ ), the high numbers of Sertoli cells per testis enable an elevated sperm production in the Mature stage. The sperm concentration, vitality, and motility presented the highest values in the Regressed stage; however, in this period, an increased incidence of sperm morphological defects was detected. In the following period (Rest stage), a drastic reduction of defective sperm was observed, suggesting quality control of sperm before the mating period. Furthermore, the epididymis ability to maintain a long-term sperm-storage was observed in 26.7% of the bats in the Maturing stage. In summary, yellowish myotis presented a fast and high sperm production during the Mature stage. These sperms are stored and selected before mating period.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

3. Ferraz FS, Dantas GPF, Coimbra JLP, López JL, Lacerda SMSN, Dos Santos ML, **Vieira CP**, Lara NLEM, Viana PIM, Ladeira LO, Guarnieri LO, Marçal EMA, Moraes MFD, Martins EMN, Andrade LM, Costa GMJ. Effects of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) testicular injection on Leydig cell function and sperm production in a murine model. *Reprod Toxicol*. 2024 Jun;126:108584. doi: 10.1016/j.reprotox.2024.108584. Epub 2024 Mar 30. PMID: 38561096.






Reproductive Toxicology

Volume 126, June 2024, 108584



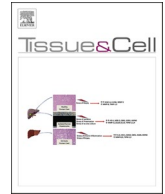
## Effects of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) testicular injection on Leydig cell function and sperm production in a murine model

Fausto S. Ferraz <sup>a 1</sup>, Graziela de P.F. Dantas <sup>a 1</sup>, John L.P. Coimbra <sup>a</sup>, Jorge L. López <sup>b</sup>,  
Samyra M.S.N. Lacerda <sup>a</sup>, Mara L. dos Santos <sup>a</sup>, Carolina P. Vieira <sup>a</sup>, Nathália de L.E.M. Lara <sup>a</sup>,  
Pedro I.M. Viana <sup>a</sup>, Luiz O. Ladeira <sup>c</sup>, Leonardo O. Guarnieri <sup>d</sup>, Eduardo M.A. Marçal <sup>d</sup>,  
Márcio F.D. Moraes <sup>d</sup>, Estefânia M.N. Martins <sup>e</sup>, Lídia M. Andrade <sup>a c</sup>,  
Guilherme M.J. Costa <sup>a 2</sup>  

[Show more](#) 

## 8.2 Artigo publicado como primeira autora





# Optimization of spermatozoa analysis in mice: A comprehensive protocol

Carolina Pinhol Vieira, Nathalia de Lima e Martins Lara, Marcela Santos Procópio, Gleide Fernandes Avelar\*

Laboratory of Cellular Biology, Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Sperm staining  
Diluent  
Vitality  
Motility  
Sperm morphology

## ABSTRACT

Sperm quality is critical to predict reproductive alterations caused by immunological factors or toxicant agents. Yet, no detailed protocol has been published focusing on analyses of sperm parameters in mice. Our aim was to evaluate the most efficient diluent for mice sperm analyses and to optimize the sperm morphology classification, through the comparison of different staining methods. The diluents assessed were PBS (baseline), HTF, DMEM, 1 % BSA in PBS and 9 % skimmed powdered milk diluted in PBS. Spermatozoa were evaluated for vitality, motility, and morphology, smears were stained with Papanicolaou, HE, Giemsa, and Rapid staining. Sperm vitality and total motility reached better scores in milk based and DMEM diluents. HE raised up as an effective option since its combination with any of the diluents we tested, resulted in a fair staining, which was appropriated to evaluate mice spermatozoa. Finally, based on WHO manual, we have updated the current morphological classification for mice sperm, since we have detailed the head defects as well as included midpiece and tail defects on it. Taken together, we presented a useful, low cost, and reliable method to assess sperm morphology that could be employed worldwide by laboratories dedicated to study reproductive biology on mice model.

## 1. Introduction

The spermatozoon is the male gamete, which is produced through spermatogenesis in the testis and has the role of fertilizing the oocyte to produce offspring. Its structure is characterized by head, midpiece and tail or flagellum, each performing an important function. The head contains half of the paternal genome and the acrosome, a highly specialized organelle that penetrates the zona pellucida of the oocyte. The midpiece contains mitochondria that provide the energy to the sperm tail motility (Yanagimachi, 1994). Defects on these structures can lead to infertility, since abnormalities on the sperm midpiece and tail affect the motility, making it difficult for the spermatozoon to reach the female gamete, while head abnormalities may impair the interaction between sperm and oocyte, essential for fertilization and formation of the zygote (Florman and Storey, 1982; Berruti and Paiardi, 2011; Shen et al., 2019).

Evaluating the sperm quality is an important procedure to assess male fertility, aiming to predict testis function (Barth and Oko, 1989).

Changes in the male reproductive system may be caused by immunological factors after infections or obesity conditions, as well as by exposure to chemicals and toxicants, such as medicines, synthetic hormones, environmental contaminants, nanoparticles, x-ray, among others, due to its potential mutagenic, teratogenic, and carcinogenic activities. This exposure reflects changes in the testis, alterations on hormone levels, defects on spermatogenesis and on the structure and function of the seminiferous tubules, epididymis, sexual accessory glands and reproductive parameters, ultimately inducing sperm abnormalities (Wyrobek and Bruce, 1975; Gray et al., 1997; Padmalatha Rai and Vijayalaxmi, 2001; Nilsson et al., 2012; Greco et al., 2015; Sanabria et al., 2016; Borges et al., 2017; Martinez et al., 2017).

Sperm viability, or vitality, is clinically important, as it demonstrates whether the spermatozoa are alive or dead through the evaluation of cell membrane integrity (Jouannet et al., 1988; Larsen et al., 2000; Zinaman et al., 2000). In addition, the integrity and morphology of the sperm structures are critical for the best spermatozoa performance. Also, its quality can be related to sperm motility, essentially required for

*Abbreviations:* BSA, bovine serum albumin; DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium; HE, hematoxylin-eosin; HTF, human tubal fluid; PBS, phosphate buffer saline.

\* Correspondence to: Laboratory of Cellular Biology, N3-147. Institute of Biological Sciences - Federal University of Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

E-mail address: [gleideav@yahoo.com.br](mailto:gleideav@yahoo.com.br) (G.F. Avelar).

<https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102463>

Received 14 January 2024; Received in revised form 14 June 2024; Accepted 3 July 2024

Available online 6 July 2024

0040-8166/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

fertilization in mammals (Barth and Oko, 1989; Kavamoto et al., 1999, Streit et al., 2008).

Sperm collection in animals can be performed in several ways, such as electroejaculation or dissection of the epididymis. However, there is no consensus in literature regarding the best technique to obtain sperm from mice and a wide variety of techniques are used. The method chosen can influence viability of the spermatozoa and/or result in a low volume of the sperm suspension acquired. Due to this, it may be required the dilution of the sperm suspension with a culture medium, enabling its use (Davis and Katz, 1992; King et al., 1994; Tecirlioglu et al., 2002a; Tecirlioglu et al., 2002b; Yonezawa et al., 2005; Yamauchi et al., 2007; Duselis and Vrana, 2007).

Based on this information and being aware of the importance of analyzing the damage sperm cells may suffer from immunological or toxicant agents, there is a need to standardize the available sperm examination techniques in mice to increase the reproducibility of the studies, minimizing potential sources of errors and allowing the comparison of data obtained from different groups (Krause and Viethen, 1999; Smith and England, 2001). In this context, the aim of our study was to evaluate the most efficient diluting medium for the analysis of mice spermatozoa. In addition, we sought to optimize the sperm morphology evaluation method initially described by Wyrobek and Bruce (1975), as well as to compare different staining methods to determine which one suits better each preparation of mice sperm.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals, sperm collection and processing

Forty sexually mature (70 days old) C57BL/6 male mice were housed in a standard animal facility at the Department of Morphology of the Federal University of Minas Gerais, under controlled photoperiod (12:12 h light and dark cycles) and access to water and food *ad libitum*. The experimental procedures were performed according to the National Institutes of Health guidelines for caring and using of Laboratory Animals (NIH) and Brazilian National Council for the Ethics in Animal Experimentation (CONCEA). All protocols were previously approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Federal University of Minas Gerais (CETEA/UFMG – Protocol #197/2015).

The mice were euthanized through intraperitoneal injection of sodium thiopental (150 mg/kg) and the anogenital distance (AGD) was measured using a digital caliper. Body mass, epididymis, testis, and seminal vesicles weights were registered. The epididymides were used for sperm collection, which will be described further ahead. Testis and seminal vesicle weight, as well as the body weight and anogenital distance, were used to classify all animals within the normal standards.

The sperm suspensions were prepared from both epididymides by manual dissection with 24 G needles in a Petri dish containing 500µL of the tested medium. After this procedure, the sample was collected and homogenized in a microtube for the analyses. The protocols used in this study were adapted from the World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen (World Health Organization, 2010). All analyses were performed under light microscope with a controlled temperature of 35.5°C, that represents the basal temperature of mice testes.

### 2.2. Diluents

The media tested for sperm dilution were chosen among the most cited in the literature: (1) commercial Modified Human Tubal Fluid (#90126; HTF – Irvine Scientific, Santa Ana, California) (Borges et al., 2017); commercial Dulbecco's modified eagle's medium (#12500-062; (2) DMEM/F12 - Gibco, Grand Island, NY) (Perini, 2007); (3) a solution of 1 % bovine serum albumin (A7906; BSA – Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) (Matsuoka et al., 2006) diluted in PBS; and (4) 9 % skimmed powdered milk (Itambé, Minas Gerais, Brazil) (Duselis and Vrana, 2007)

diluted in PBS. Phosphate buffer saline (PBS) without supplementation was used as a control to establish the baseline.

### 2.3. Sperm counting

The number of spermatozoa was assessed using 10µl of the sample in a Neubauer chamber (4×4; Lo-Laboroptik, United Kingdom) under light microscopy, at 400x magnification. At least 200 spermatozoa were counted on the central grid until the row was complete. The counting was done in both chambers using the same number of rows, and the concentration was calculated using the formula  $C = (N/n) \times (1/25) \times DF$ , which represents an average of the number of spermatozoa counted in both chambers (N) divided by the number of rows (n) examined, multiplied by 1/25, and DF is the dilution factor (DF; in case of 1:51, DF=51) (World Health Organization, 2010).

### 2.4. Sperm vitality

The sperm vitality test was performed using eosin (0.5 % of eosin Y dissolved on 0.9 % NaCl in purified water), in which 5µL of sperm suspension was mixed with 5µL of the eosin solution in a microscope slide and covered with a 22 mm x 22 mm coverslip. The sample was examined under an optical microscope at 400x magnification and at least 200 spermatozoa were evaluated. Stained spermatozoa were counted as dead, while the non-stained were counted as alive.

### 2.5. Sperm motility and agglutination

The motility of the spermatozoa was evaluated using 10µL of the sample on a slide covered with a 22 mm x 22 mm coverslip. In this analysis, 200 sperm were counted under an optical microscope at 400x magnification, and the motility was graded as progressive (spermatozoa moves forward and actively or in a large circle, regardless of velocity), non-progressive (spermatozoa moves in small circles or on the same spot without progression), and immotile (no movement detected) (World Health Organization, 2010). Total motility was assigned as the sum of progressive and non-progressive motility.

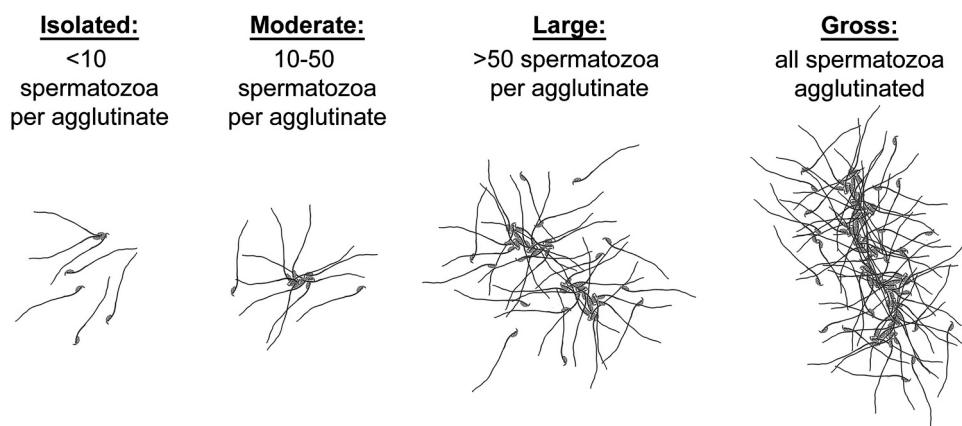
Regarding agglutination, if present, it was evaluated as isolated (<10 spermatozoa per agglutinate), moderate (10–50 spermatozoa per agglutinate), large (>50 spermatozoa per agglutinate), or gross (all spermatozoa agglutinated) (Fig. 1).

### 2.6. Sperm smears quality and morphology

The sperm smears were prepared by spreading 10µL of the sample along the surface of a glass slide, which was air-dried and fixed with 95 % ethanol for 15 min. Papanicolaou, Rapid staining, Hematoxylin-Eosin (HE) and Giemsa were the staining methods tested for the mice sperm morphology analysis and for the evaluation of the quality of the sperm smear with each medium.

Papanicolaou staining procedure was performed according to the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (World Health Organization, 2010). The staining protocol involved graded ethanol, commercial hematoxylin without acetic acid, purified water, acidic ethanol (1.0 mL of concentrated hydrochloric acid added to 200 mL of 70 % ethanol), G-6 orange stain (10 g of orange G crystals on 100 mL purified water and then 50 mL diluted on 950 mL of 95 % ethanol and 0.15 g of phosphotungstic acid), commercial EA-50 green stain followed by ethanol and xylene. The dyeing process lasts around 40 min.

The Rapid staining procedure (#0072; Renylab, Minas Gerais, Brazil) was performed using the Fixative Solution, composed by triaryl methane, the Stain Solution 1, composed by xanthene, and the Stain Solution 2, with thiazine. The slides were dipped in each solution for 1 min allowing the excess to drain after each dip, rinsed in water and air dried.



**Fig. 1.** Agglutination degrees are classified based on the number of spermatozoa forming a cluster. The illustration represents the different degree of agglutination that can be observed during sperm analysis, in C57Bl/6j mice. Isolated (<10 spermatozoa per agglutinate), Moderate (10–50 spermatozoa per agglutinate), Large (>50 spermatozoa per agglutinate), and Gross (all spermatozoa agglutinated).

The staining technique using HE (adapted from Aksoy, 2012) consists on immersing the slides in histological hematoxylin for 5 min, quickly washing unbound dye in tap water, immersing the slides on histological eosin for 5 min, quickly washing it in tap water and allowing the slide to air dry. The process takes less than 15 min.

Giemsa staining was prepared by mixing 0.77 mg of Giemsa powder (Merck) with methanol and glycerol (75 mL absolute alcohol and 25 mL of glycerol) and keeping it for 2–3 h at 40°C (Chowdhury et al., 2014). After the filtration, the stock solution was stored in an amber bottle, at room temperature for 7 days before use. The staining solution was prepared by mixing 3 mL of the Giemsa stock solution, 2 mL of PBS and 45 mL of distilled water. The slides were immersed in the solution for 30 min, then quickly washed and air-dried.

## 2.7. Staining index

The quality of the sperm smears, based on the intensity of the staining, was examined under an optical microscope at 400x magnification. The criteria applied in these analyses were the presence of overall background and the intensity of head and tail coloration, considering each staining method and diluent used for sperm preparation. To evaluate the differences in the smear quality, 10 fields in each slide were analyzed and graded as follows: 0 = absence of staining or background, 1 = weak, 2 = moderate or 3 = intense staining or background (adapted from Barth and Oko, 1989). The head and tail coloration were expected to be more intense, making it easier to identify defects of structure, acrosome and midpiece. At the same time, the background intensity is desirable to be lower, because it can interfere with the morphological evaluation of the spermatozoon. Therefore, the grade (Q) was calculated by adding the grades for head (H) and tail (T) intensity and subtracting the value for the background (B) as in the formula  $Q = (H+T) - B$ . Finally, the score obtained for each staining using PBS medium (stated as base line) was subtracted from the Q value, rendering the Staining Index (SI).

The sperm morphology analysis was adapted from Wyrobek and Bruce (1975). Initially, spermatozoa were classified as normal or abnormal, and the anomalies were grouped as hookless, banana-like form, amorphous, folded on themselves or doubled-tails sperms. However, there was a need to include other defects of head, insertion of the midpiece and defects on the tail that were also observed on the mice sperm during the analysis.

## 2.8. Statistical analysis

Data were tested for normality using D'Agostino & Pearson test. Biometric and spermatoc data were analyzed by one-way ANOVA and

two-way ANOVA was used to assess the interaction effect of staining method in combination with diluent. Tukey's post-hoc test was used for multiple comparisons analysis. All statistical analysis were performed using GraphPad Prism (version 6; GraphPad Software Inc.). The level of significance considered was  $p < 0.05$  and the values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

## 3. Results

### 3.1. Biometric data and sperm counts

Body, testis, epididymis, and seminal vesicle weights as well as the gonadosomatic and anogenital indexes ranged within a typical interval, as expected for strain and age. Therefore, no deviations associated with individual were present and the groups were homogeneously settled. In this regard, the main source of variation was due to the tested media (Table 1). Corroborating the biometric data, sperm concentration was around  $283.9 \pm 13 \times 10^6$  (Table 1) and did not differ among groups.

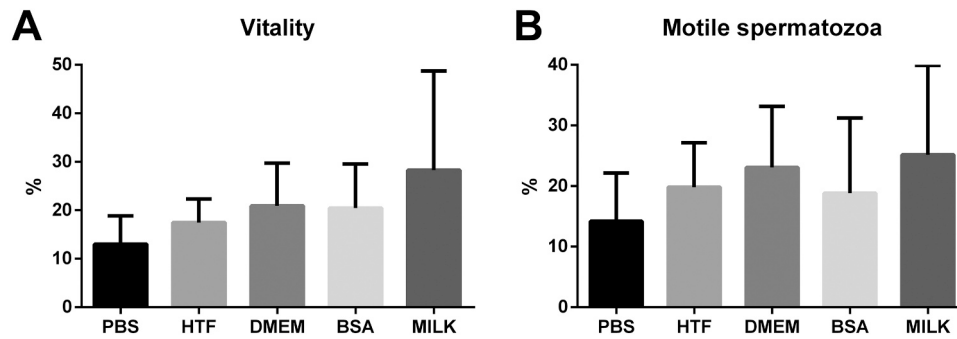
### 3.2. Sperm parameters

Sperm vitality (Fig. 2a) and total motility (Fig. 2b) showed similar pattern among the groups evaluated and, despite the absence of

**Table 1**  
Biometric data and sperm concentration (mean  $\pm$  SD).

	General mean <sup>1</sup> (n = 40)	PBS (n = 8)	HTF (n = 8)	DMEM (n = 8)	BSA (n = 8)	MILK (n = 8)
Body weight (g)	24.7 $\pm$ 2.4	24.8 $\pm$ 2.8	24.1 $\pm$ 1.8	24.7 $\pm$ 3.8	24.7 $\pm$ 2.0	24.4 $\pm$ 1.8
Testis weight (mg)	102.1 $\pm$ 21.3	90.7 $\pm$ 32.5	101.3 $\pm$ 9.5	100.3 $\pm$ 19.5	104.5 $\pm$ 20.6	102.1 $\pm$ 18.0
Gonadosomatic index	0.82 $\pm$ 0.15	0.71 $\pm$ 0.18	0.85 $\pm$ 0.13	0.8 $\pm$ 0.09	0.85 $\pm$ 0.17	0.84 $\pm$ 0.15
Seminal vesicle weight (mg)	169.5 $\pm$ 43.8	177.1 $\pm$ 59.7	162.4 $\pm$ 23.3	167.1 $\pm$ 58.1	167.7 $\pm$ 23.5	168 $\pm$ 45.3
Epididymis weight (mg)	39.2 $\pm$ 9.1	34.8 $\pm$ 11.3	41.1 $\pm$ 7.1	39.1 $\pm$ 8.1	38.7 $\pm$ 7.4	36.8 $\pm$ 9.0
Anogenital index	4.1 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 0.6	3.65 $\pm$ 1.0	4.18 $\pm$ 0.6	4.4 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.3
Sperm concentration ( $\times 10^6$ )	5.57 $\pm$ 0.26	6.52 $\pm$ 0.95	5.35 $\pm$ 0.3	4.26 $\pm$ 0.5	6.41 $\pm$ 0.43	5.45 $\pm$ 0.22

<sup>1</sup> General mean considered the total number of animals (n = 40). PBS, phosphate buffered saline; HTF, human tubal fluid; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; BSA, 1 % bovine serum albumin in PBS; Milk, 9 % skimmed powdered milk in PBS.



**Fig. 2.** Vitality and total motility of mice sperm assessed after dilution in PBS, HTF, DMEM, BSA and Milk. Although there are not significant differences, vitality (A) ranged from 13 % in PBS to 28 % in milk diluent while motility (B) was lower in PBS (14 %) and higher in milk (25 %).

statistical significance, spermatozoa prepared with powdered milk-based diluent presented a slightly better performance for vitality (28 %) and total motility (25 % A+B). However, the analyses of the motility pattern revealed higher progressive motility (A) for DMEM ( $4\% \pm 1.5$ ) when compared to milk ( $0.24\% \pm 0.1$ ) and BSA ( $0.36\% \pm 0.2$ ) diluents ( $p < 0.05$ ; Table 2).

The absence of aggregates and isolated agglutination were most frequently observed in our samples (Table 2). It is worth mentioning that the agglutination did not affect the evaluation of the sperm since the experimental conditions did not result in gross agglutination.

### 3.3. Staining index (SI)

Qualitative data regarding the spermatozoa staining, in combination with different diluent media, are summarized in Fig. 3. In general, Papanicolaou resulted spermatozoa lightly stained. Heads were blue, tails were pink or blue, and the acrosome was not visible (Fig. 3a, e, i, m, q). The solution based on milk presented a blue/purple background that impaired a good visualization of the tail (Fig. 3q). A SI significant difference was observed between BSA and DMEM ( $p = 0.0482$ ), which indicates BSA as a good medium to use in combination with Papanicolaou staining (Fig. 4A).

The Rapid Staining (RS) method led to a range of blue, purple, or pink color intensities in the spermatozoa (Fig. 3b, f, j, n, r). The granular aspect of the background was observed spreading over the spermatozoa. The presence of this bias was critical for the evaluation of sperm morphology in these samples. The acrosome was barely visualized, except when sperm heads were strongly dyed, and a contrasting gradient was established between the condensed nuclei and the acrosomal vesicles. The spermatozoa prepared in the BSA solution showed a foggy appearance (Fig. 3n), whereas a bluish shadow, surrounding the spermatozoa, was observed in the milk-enriched solution (Fig. 3r). The evaluation of SI did not provide the better choosing of medium to be used in association with this staining technique (Fig. 4B).

**Table 2**

Progressive (A) and non-progressive (B) motility of the spermatozoa (mean  $\pm$  SD) and sperm agglutination distribution (%).

		PBS	HTF	DMEM	BSA	MILK
Motility (%)	A	2.8 $\pm$ 3.2 <sup>ab*</sup>	2.5 $\pm$ 2.5 <sup>ab</sup>	4.1 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	0.24 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
	B	11.4 $\pm$ 6.9	17.3 $\pm$ 6.9	19 $\pm$ 6.9	18.4 $\pm$ 12.6	24.9 $\pm$ 14.7
Agglutination (%)	None	0	0	12.5	12.5	25
	Isolated	50	75	50	62.5	62.5
	Moderate	50	25	37.5	25	12.5

\* Different letters in the same row mean statistical difference ( $p < 0.05$ ). PBS, phosphate buffered saline; HTF, human tubal fluid; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; BSA, 1 % bovine serum albumin in PBS; Milk, 9 % skimmed powdered milk in PBS.

Classic Hematoxylin and Eosin (HE) protocol rendered a homogeneous staining pattern, regardless the medium (Fig. 3c, g, k, o, s). Therefore, spermatozoa showing blue head and pink to orange tail reached the intensity of staining required for precise morphological evaluation. As observed from the quantitative data, all media combined with HE resulted in a reasonable staining intensity (Fig. 4C).

The artifacts observed after Giemsa staining followed the pattern already mentioned for the Rapid Staining. Granules from the background were overlapping the sperm silhouette (Fig. 3l), and BSA diluent was leading to a blurred effect in the spermatozoa (Fig. 3p). Although it was not a recurrent condition, HTF contributed to the visualization of the acrosome (Fig. 3h) while the intense background raised from milk-based diluent associated with Giemsa reagents resulted in the negative image of the sperm (Fig. 3t). In this regard, the worst staining resulted from the combination with milk-based diluent solution (Fig. 4D).

The two-way ANOVA indicated a significant interaction between diluent and staining factors ( $p = 0.0267$ ), which corresponded to 12.5 % of the total variance. Indeed, the diluent factor affected the results, and it accounts for 15.41 % of the total variance ( $p < 0.0001$ ). Fig. 5 shows that the milk-based diluent + Giemsa was the worse combination, especially when compared to BSA + Papanicolaou ( $p = 0.0006$ ), DMEM + RS ( $p = 0.0196$ ), HTF + HE ( $p = 0.028$ ), DMEM + HE ( $p = 0.0468$ ), BSA + HE ( $p < 0.0071$ ).

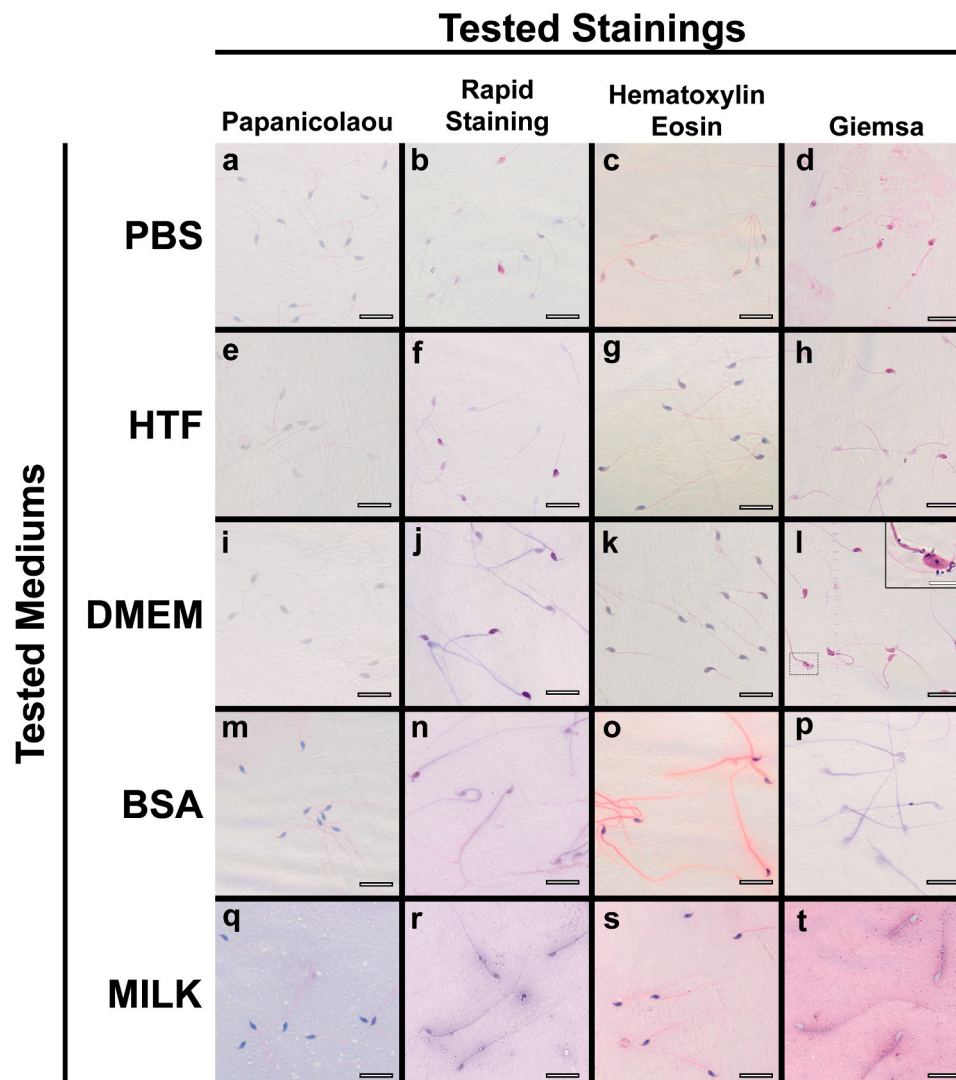
### 3.4. Morphology

As we had defined the best protocols that favored the sperm morphology assessment, we executed a thorough evaluation of the spermatozoon defects. The detailed characterization of the different defect types is available in Fig. 6 (head) and 7 (midpiece and tail).

Besides the known abnormal types of head, such as the absence of the usual hook (hookless spermatozoon), banana-like and amorphous, we found spermatozoa depicting narrow, macrocephalous, doubled-head, or headless shaped (Fig. 6). Regarding the midpiece, we observed the irregular insertion, thicker, smaller, and midpiece-only patterns (Fig. 7). We also described defects of tails, which we assigned to bent, coiled, or doubled tail and segmented agenesis of the tail (Fig. 7).

## 4. Discussion

Mice represent the most used mammalian species as an animal model in scientific research worldwide (Morse, 2007; Martinez, 2022), but in contrast to their multiple applications on biological field, still there is a lack in the knowledge regarding reliable techniques to perform sperm collection and analysis of the spermatid parameters (spermatozoon morphology, vitality, and motility) (Martinez, 2022). To date, the existing protocols have rendering miscellaneous results which impairs the comparison among studies and approaches already referred in the literature. Herein, we prepared the sperm samples with combined diluents (D, 5) and staining protocols (S, 4) and compared twenty different



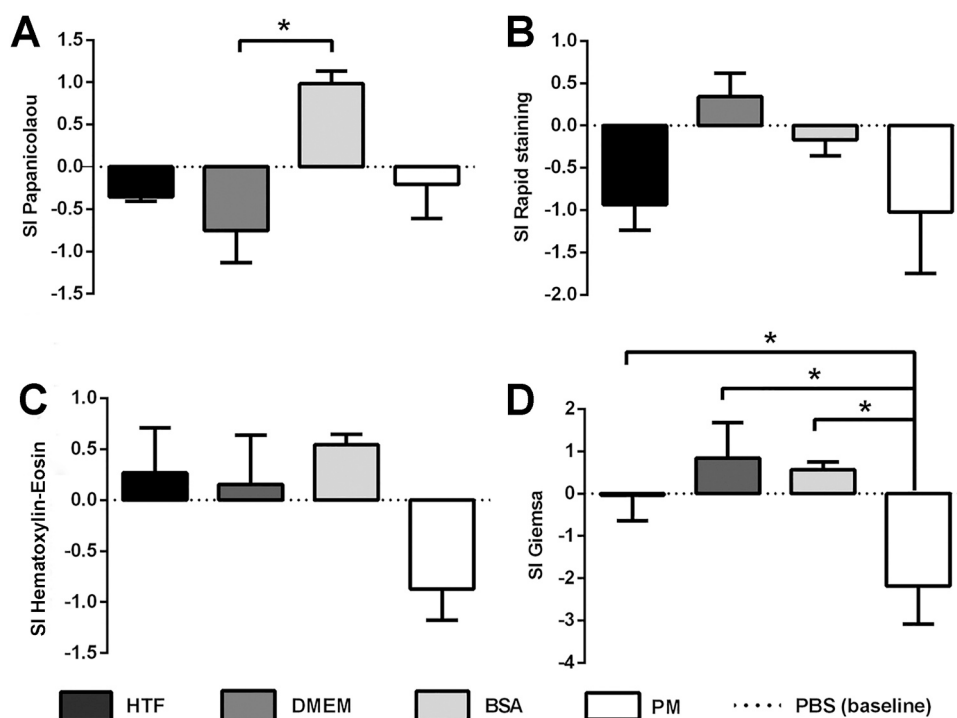
**Fig. 3.** Qualitative evaluation of sperm smears stained following the combination of four different dyes and five diluents. Papanicolaou was more intense when associated with BSA (m) but produced a very light staining using DMEM (i). On the other side, the Rapid staining and Giemsa presented a nice staining combined with DMEM (j, l) although milk solution (r, t) rendered a poorly definition of the sperm parts. The insert in (l) highlights the presence of particles that were commonly seen, after using both dyes, on the background and covering some spermatozoa, affecting the sperm evaluation. Finally, the Hematoxylin-eosin yielded a fair staining intensity, regardless of the diluent it was combined with (c, g, k, o, s). Bars a-t: 12  $\mu$ m; Bar insert: 3  $\mu$ m.

experimental conditions (D x S). Using this strategy, we were able to find out which combination best fit for confident assessing of the morphology of spermatozoa, through a simple microscopy evaluation.

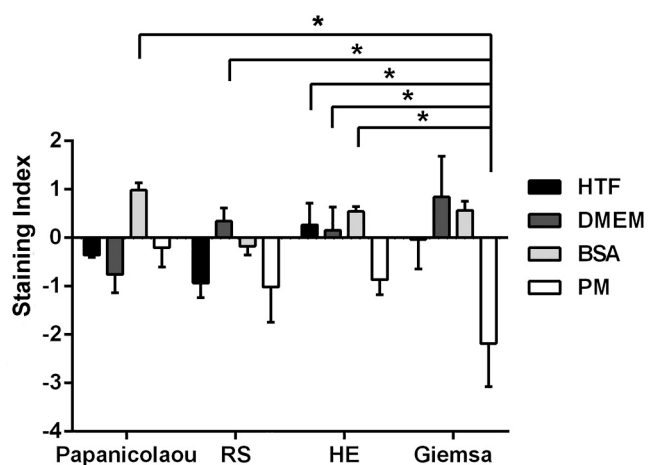
In mammals, the sperm quality may be altered due to infections, metabolic disorders, obesity, stress, as well as other factors such as the abstinence period or even the method for sperm collection (Turek, 1997; Moretti et al., 2008; Stewart et al., 2009; Janevic et al., 2014; Comar et al., 2017). Besides that, the exposure to different chemicals and toxicants may cause damage in the male reproductive system and even reprogram germ cell characteristics, inducing sperm abnormalities and changes in the testis structure and function (Wyrobek and Bruce, 1975; Janevic et al., 2014; Greco et al., 2015; Sanabria et al., 2016; Comar et al., 2017; Martinez et al., 2017). In overall, the size of the testis has a positive and significant correlation with the total number of spermatozoa produced, while the seminal vesicle weight and the anogenital index are parameters related to the androgen levels which also regulates the spermatogenesis. Therefore, these parameters may also reflect on sperm quality. So that, the biometry, and sperm concentration of the animals we used were homogeneous and ranging within the standards for the C57Bl/6j strain (Oliveira et al., 2020).

Dissection of the epididymis is the method for sperm collection most used in mice, so far (Duselis and Vrana, 2007). It is fast, cheap and has shown positive results for artificial insemination and for *in vitro* fertilization (Duselis and Vrana, 2007; Del Val and Robledano, 2013; Windhofer et al., 2023), leading to the higher viability and lower susceptibility of the sperm to DNA damage, when compared to other techniques. Electroejaculation, artificial vagina, administration of drugs such as yohimbine, an alpha2-adrenergic receptor antagonist involved in the modulation of the ejaculatory capacity of the animal, or the collection of semen directly from the uterus of females after intercourse were successfully used for diverse species, such as dogs, ruminants, and horse, but usually presented unsatisfactory results for mice (Love, 1992; Tecirlioglu et al., 2002a; Tecirlioglu et al., 2002b; Yamauchi and Ward, 2007; Yamauchi et al., 2007). Recently, Windhofer and colleagues (2023) intended to standardize the percutaneous epididymis sperm aspiration as a substitute to the epididymis dissection to retrieve mice spermatozoa for IVF assays. But, similarly to the other alternative procedures, the quality of sperm was extremely low, invalidating their use in fertilization approaches (Windhofer et al., 2023).

It is well known that spermatozoa acquire motility during the



**Fig. 4.** Papanicolaou (A), Rapid staining (B), Hematoxylin-Eosin (C) and Giemsa (D) staining Index (SI). In overall, positive values indicate staining with low background, and good definition of the sperm segments. Otherwise, negative SI means low definition of the afore-mentioned parameters. Note that Papanicolaou resulted in better staining when combined with BSA diluent in comparison with DMEM ( $p < 0.05$ ). No differences were observed among SI for Rapid staining, although a positive index had been obtained when it was combined with DMEM. Hematoxylin-Eosin SI was positive for HTF, DMEM and BSA diluents and there were no differences among them. Observe that milk-based diluent resulted in a very low SI for Giemsa ( $p < 0.05$ ), which is a counter-indication for their combined use.



**Fig. 5.** Overall comparison of Staining Index obtained from sixteen staining and diluent experimental combinations. Observe that milk-based diluent (PM) resulted in negative SI no matter the staining utilized, but the worst performance was registered with Giemsa, which was significantly different from Papanicolaou + BSA; RS + DMEM; HE + HTF; HE + DMEM, and HE + BSA ( $p < 0.05$ ).

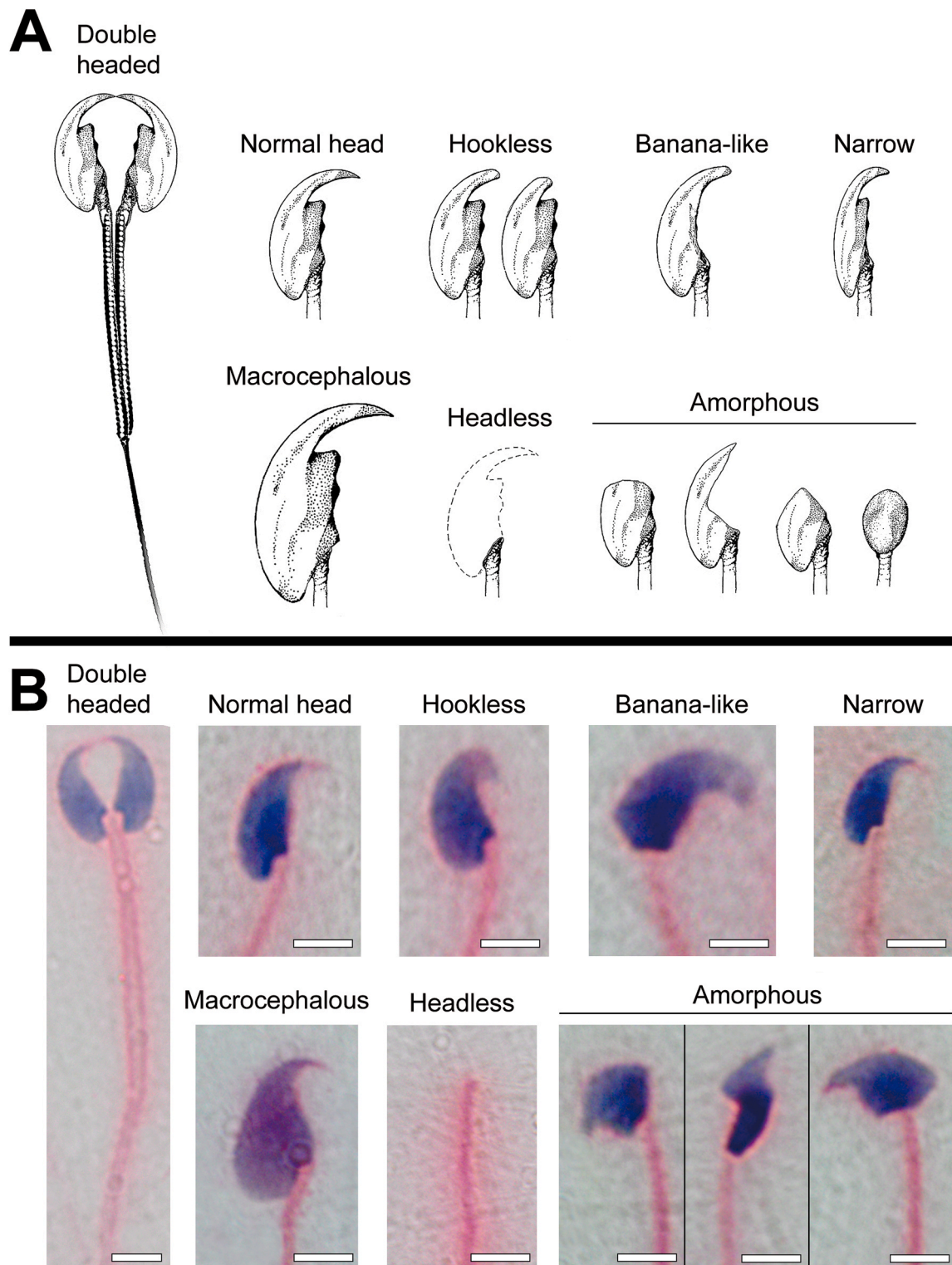
epididymis transit, reaching the cauda epididymis with the complete tools needed to fertilize the oocyte (Reid and Cleland, 1957; Robaire, Hermo, 1988; Hinton and Setchell, 1993; França, Chiarini-Garcia, 2005). However, distinct levels of maturation are expected when the spermatozoa age is considered (Jones et al., 2007). In terms of supporting a full-term development, spermatozoa retrieved from caput as well as cauda epididymis have demonstrated comparable results when ICSI was used (Zhou et al., 2019; Wang et al., 2020).

In the present study, the sperm was collected from the whole

epididymis, and the total motility ranged between 14 % and 25 %. However, the effects of diluents on the sperm parameters, for instance, motility, were already mentioned for varied species such as rabbit, human and bull (Farrell et al., 1996; Risopatrón et al., 2002). Thus, different diluent may affect the motility, even of the spermatozoa collected from the cauda epididymis. Nabavi and colleagues (Nabavi et al., 2013) found 37 % and 61 % of motile sperm using T6 and M16 media, respectively, while Coffua and Martin-DeLeon (2017) diluted the spermatozoa from cauda in HTF and found about 45 % of motile gametes. Therefore, despite the differences carried from the diluent, spermatozoa from the cauda epididymis are more appropriate for artificial insemination or *in vitro* fertilization studies, where there is a need of progressive motile spermatozoa.

The staining techniques, as established in the World Health Organization manual, are used for assessing the sperm vitality (World Health Organization, 2010). For humans, eosin and eosin-negrosin stains are indicated, and the interpretation of the result is related with the integrity of cell membrane. Eosin, combined with different diluents, has been used to evaluate vitality in mice, although the percentage of alive spermatozoa varied according to the diluent medium (Kermani-Alghoraisi et al., 2010; Nabavi et al., 2013). So that, this ranging is suggesting that the medium can affect the viability of the sperm or even alter the permeability of the cell membrane to the stain. Indeed, due to the high percentage of dead spermatozoa found in this study and the fact that the technique was initially perfected in human sperm, our hypothesis is that the mice sperm cell membrane is more permeable to the eosin stain. We also observed that the time was crucial for the analysis, since the longer we took to count, the more spermatozoa were classified as dead. Therefore, the eosin stain may be a technique to evaluate the permeability of the cell membrane and not the vitality of the spermatozoa. However, more studies are required to corroborate with our hypothesis.

The media used in this approach were already validated to mice.

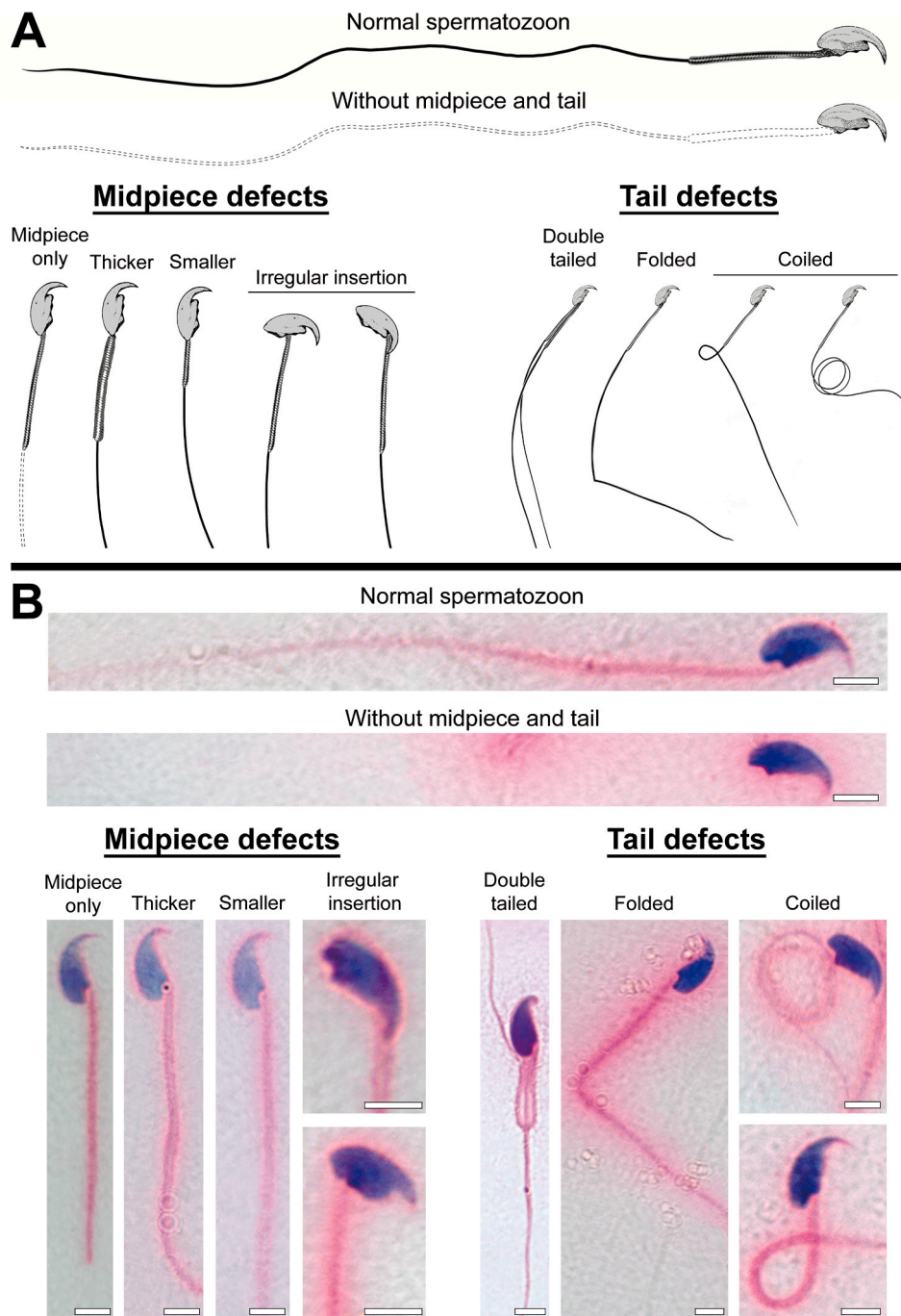


**Fig. 6.** Assessment of head morphology of mice spermatozoon. (A) Schematic representation of normal and abnormal head shapes of the mice sperm. (B) Corresponding micrographs of the different head defects that can be observed when analyzing the mice sperm smear. Bars: 4  $\mu$ m.

Thus, HTF, normally used in human spermatozoa for assisted reproduction techniques, is largely utilized on research studies in different animals, specially mouse and rat (Risopatrón et al., 2002; Borges et al., 2017; Coffua and Martín-DeLeon, 2017); DMEM, which is commonly used for several types of cell culture, including bull semen (Perini, 2007); 1 % BSA in PBS, since albumin is an important component of seminal fluid (Matsuoka et al., 2006), and 9 % skimmed powdered milk

in PBS, which has important factors for sperm nutrition (Duselis and Vrana, 2007). Therefore, it is not clear whether the overall low percentage of vitality, as we registered through the eosin test, is because of the diluents or any other variable that remains to be identified.

Notwithstanding we have demonstrated a slight better vitality (28 %) and total motility (25 % A+B) of the sperms prepared in the milk-based diluent, the analyses of the motility pattern showed better



**Fig. 7.** Midpiece and tail morphology of mice spermatozoon. (A) Schematic representation of normal and abnormal midpiece and tail alterations found in mice sperm. (B) Corresponding micrographs of the different defects that can be seen when analyzing the mice sperm smear. Bars: 4  $\mu$ m.

progressive motility (A) using DMEM when compared to milk. We attributed this behavior to the presence of big particles both in milk based and in BSA diluents, which have presented equivalent results. The dilution of the powdered components may have created a denser milieu that impaired the progressive motility of spermatozoa.

Sperm morphology is a low cost first-line analysis and renders a reliable result when performed by a well-trained observer. It has a key role as a predictor of the sperm function, despite DNA fragmentation has been identified in morphologically normal spermatozoa (Ferrigno et al., 2021; Ganeva et al., 2021) and it may explain the low ratio of embryo development in some attempts of assisted fertilization. Back in the middle 1970's, Wyrobek and Bruce came with the first description of the morphology of mouse spermatozoa, after the treatment using

twenty-five different chemicals (Wyrobek and Bruce, 1975). Even under this condition, they were able to distinguish no more than a couple of abnormal spermatozoon types, which they classified as hookless, banana-like, amorphous, folded on themselves and double tails. Although there is no mention to midpiece defects, that paper represents a milestone and has been cited by many others since then. So that, it is evident a lack of information regarding sperm defects, especially those in the midpiece and tail. Herein, we revisited the abnormal morphology of mouse spermatozoa, evaluating the sperm from mice housed under regular conditions, not submitted to any experimental approaches. Beyond the head defects formerly described by Wyrobek and Bruce (1975), we found narrow, macrocephalous, no head and double head spermatozoa. In addition, the midpiece defects might represent an



impairment of sperm motility since it is the metaphorical engine of the spermatozoon. So far, we did not address any further evaluation of the mitochondrial sheet however, the defects we described in this segment of the sperm, for instance, asymmetrical head-insertion, thicker, smaller, and midpiece-only, lead us to raise with this hypothesis. Regarding tail defects, we have added a piece of information to the previously reported, as we characterize folded, coiled, and absence of midpiece and tail. Indeed, regardless the defect type, the consequences for fertilization and even embryo development are remarkable.

Morphological alterations may be consequence of metabolic disorders during the spermiogenic phase of spermatogenesis, when rounded spermatids go through intricate maturation and morphological changes, as condensation of the chromatin, formation of the acrosome, midpiece and flagellum, and elimination of the residual cytoplasm to form the spermatozoa (Kierszenbaum, 1994; Tanaka and Baba, 2005; Hess and França, 2007; Rajender et al., 2010). Cellular organelles have a key role in this process, for instance, the Golgi apparatus surrounding the condensed nucleus and creating the vesicles and lysosomes carrying the enzymes that form the acrosome, the mitochondria packaged into the midpiece, and the centrioles elongating to form the flagellum (Tang et al., 1982; Raposo et al., 2007; Rajender et al., 2010; Cheng and Mruk, 2011). These events are coordinated through the expression of testis-specific genes which transcription and translation are programmed and takes place at different moments of the spermiogenesis (Tanaka and Baba, 2005). Thus, the exposure to mutagenic or toxic agents often results in sperm defects and male infertility (Nantel et al., 1996; Cho et al., 2001; Zhang et al., 2001; Pan et al., 2005; Wu et al., 2016; Mathur et al., 2023).

The level of reliability for describing sperm morphological defects increases as the quality of sample staining improves. Different staining methods have been used to assess sperm morphology as well as the integrity of the acrosome in human, such as Papanicolaou, Shorr, Diff-Quick, Hematoxylin-Eosin, Toluidine Blue, and Giemsa (Tartaglione and Ritta, 2004; World Health Organization, 2010; Aksoy et al., 2012). However, there is not a consensus regarding staining methods suitable for mice sperm analysis. To improve the available protocols for sperm morphology evaluation, decreasing the bias due the staining preparation, we compared different protocols: Papanicolaou and the Rapid staining, which are used for human sperm; Giemsa, which showed satisfactory results for acrosome visualization in other species (Chowdhury et al., 2014), and Hematoxylin-Eosin (HE), commonly used for histological analysis of several tissues. We observed that the staining procedures worked quite differently when they were combined with diluent media. However, HE presented more stable quality of staining when in combination with the five diluents assessed, avoiding a wide variation in terms of intensity and background, different from that observed for Papanicolaou, Rapid staining and Giemsa. Thus, since HE is an affordable quite common staining that is found in the most of reproductive biology laboratories, and which has resulted in a fair staining, regardless the diluent it was combined to, we suggest it as a valid choice for sperm morphology. Unfortunately, none of the staining methods we have evaluated provided an outstanding visualization of the acrosome.

Indeed, we reinforce that a reliable morphology evaluation must be conducted in association with computer assisted sperm analysis (CASA) since they should be considered as complementary techniques. In a recently published systematic review, Finelli et al. (2021) showed that CASA is a good tool to evaluate concentration and motility of sperm, since the variation stays within the acceptable range levels. So that, there are devices tools for categorizing progressive motility based on velocity (fast, medium, slow), and linearity. On the other hand, the classification of sperm movement, performed by the laboratory technician, may not reflect the level of accuracy, since some variation among different observers might impair the repeatability and reliability. For this specific sperm kinematic analysis, computerizing evaluation yields high profile quality control (Cooper and Yeung, 2006). Sperm

morphology analysis is also an obstacle to get over after using this approach but, with the artificial intelligence insertion to help recognizing the multiple sperm variations, authors consider the possibility to use CASA with a high level of reliability (Finelli et al., 2021). It is worth noting that CASA does not include the assessment of midpiece and tail regions, as stated in WHO guidelines (World Health Organization, 2021). Thus, facing the current available tools, it is recommended the manual instead of computerized sperm morphology analyses.

Even though our work targets on mice sperm, this same protocol was already tested in other animal species such as rat (*Rattus norvegicus*), snakes (*Micrurus frontalis* and *Crotalus durissus*) and bat (*Myotis levis*, Farias et al., 2021) from studies developed in our laboratory, proving to be easily adaptable to different spermatozoa morphologies. Based on that, herein we assessed the affordable combinations between diluent and stain types, so that, other researchers would have a chance to choose the best to their aims, from a critically tested bunch of possibility.

## 5. Conclusion

In summary, it can be concluded that the diluent can affect the vitality and the motility of mice spermatozoa, and, in this regard, DMEM/F12 and 9 % skimmed powdered milk solution showed the best results under the conditions of the present study for all parameters evaluated. We recommend the use of DMEM because it is a safe, affordable and common medium used in laboratories, with smaller particles that does not impair the sperm progressive motility. In addition, HE provided a trustworthy staining of the sperm head and tail regardless of the diluent, with non-impairing background. Also, we presented the revised mice sperm morphology, which was further detailed regarding the classification of defects, enabling us to predict the issues at spermatogenesis and fertilization levels. Finally, we established a comprehensive adaptation of the WHO protocol for the examination and processing of human semen, making it suitable and optimized for mice spermatozoa analysis and facilitating further studies regarding reproductive function and toxicology.

## Financial support

This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation for Research Support of Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

## CRediT authorship contribution statement

**Nathália Lima e Martins Lara:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Carolina Pinhol Vieira:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Gleide Fernandes de Avelar:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Marcela Santos Procópio:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgments

Technical assistance from Mara Lúvia dos Santos and Marco Antônio Anacleto (Scientific Illustration Laboratory, UFMG).

## References

- Aksoy, E., Aktan, T.M., Duman, S., Cuce, G., 2012. Assessment of spermatozoa morphology under light microscopy with different histologic stains and comparison of morphometric measurements. *Int. J. Morphol.* vol.30 (n.4), 1544–1550. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000400045>.
- Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press, Ames, p. 285.
- Berruti, G., Paiardi, C., 2011. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis* 1 (2), 95–98. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16820>.
- Borges, C.S., Dias, A.F.M.G., Silva, P., Rosa, J.L., Guerra, M.T., Silva, R.F., Kiguti, L.R.A., Pupo, A.S., Kempinas, W.G., 2017. Long-term adverse effects on reproductive function in male rats exposed prenatally to the glucocorticoid betamethasone. *Toxicology* 376, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.04.005>.
- Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2011. Actin binding proteins and spermogenesis: Some unexpected findings. *Spermatogenesis* 1 (2), 99–104. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16913>.
- Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., Eddy, E.M., 2001. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 28 (1), 82–86. <https://doi.org/10.1126/jmg.2005.037168>.
- Chowdhury, S., Das, S., Gupta, T., Sana, D., Bose, S., 2014. Evaluation of frozen semen by acrosomal integrity and sperm concentration - two vital quality parameters of male fertility in bovines. *Explor. Anim. Med. Res. Vol.4 (Issue - 1)*, 101–107. ISSN 2277-470X.
- Coffua, L.S., Martin-DeLeon, P.A., 2017. Effectiveness of a walnut-enriched diet on murine sperm: involvement of reduced peroxidative damage. *Heliyon* 3 (2), e00250. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00250>.
- Comar, V.A., Petersen, C.G., Mauri, A.L., Mattila, M., Vagnini, L.D., Renzi, A., Petersen, B., Nicoletti, A., Dieamant, F., Oliveira, J., Baruffi, R., Franco, J.G., 2017. Influence of the abstinence period on human sperm quality: analysis of 2,458 semen samples. *JBRA Assist. Reprod.* 21 (4), 306–312. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20170052>.
- Cooper, T.G., Yeung, C.H., 2006. Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians. *Fertil. Steril.* 85 (1), 220–224. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.07.1286>.
- Davis, R.O., Katz, D.F., 1992. Standardization and comparability of CASA instruments. *J. Androl.* 13 (1), 81–86. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1992.tb01632.x>.
- Del Val, G.M., Robledano, P.M., 2013. In vivo serial sampling of epididymal sperm in mice. *Lab Anim.* 247 (3), 168–174. <https://doi.org/10.1177/0023677213478411>.
- Duselis, A.R., Vrana, P.B., 2007. Harvesting sperm and artificial insemination of mice. *J. Vis. Exp.* (3), 184. <https://doi.org/10.3791/184>.
- Farias, T.O., Figueiredo, A.F.A., Wnuk, N.T., Vieira, C.P., Lara, N.L.E.M., Avelar, G.F., Talamoni, S.A., Costa, G.M.J., 2021. Sperm production and seminal analyses in a Neotropical sperm-storing vesperilionid bat yellowish myotis (*Myotis levis*). *Theriogenology* 174, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.018>.
- Farrell, P.B., Foote, R.H., Mc Ardle, M.M., Trouern-Trend, V.L., Tardif, A.L., 1996. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Androl.* 17 (3), 293–300. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1996.tb01785.x>.
- Ferrigno, A., Ruvolo, G., Capra, G., Serra, N., Bosco, L., 2021. Correlation between the DNA fragmentation index (DFI) and sperm morphology of infertile patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 38 (4), 979–986. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02080-w>.
- Finelli, R., Leisegang, K., Tumallapalli, S., Henkel, R., Agarwal, A., 2021. The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Transl. Androl. Urol.* 10 (7), 3069–3079. <https://doi.org/10.21037/tau-21-276>.
- Florman, H.M., Storey, B.T., 1982. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev. Biol.* 91 (1), 121–130. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90015-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90015-x).
- França, L.R., Chiarini-Garcia, H., 2005. Célula de Sertoli. In: Carvalho, H.F., Collares-Buzato, C.B. (Eds.), *Células. uma abordagem multidisciplinar*. Manole, Barueri, pp. 302–324.
- Ganeva, R., Parvanov, D., Velikova, D., Vasileva, M., Nikolova, K., Stamenov, G., 2021. Sperm morphology and DNA fragmentation after zona pellucida selection. *Reprod. Fertil.* 2 (3), 221–230. <https://doi.org/10.1530/RAF-21-0041>.
- Gray Jr, L.E., Ostby, J.S., Kelce, W.R., 1997. A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male long evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharm.* 146 (1), 11–20. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8223>.
- Greco, F., Courbière, B., Rose, J., Orsière, T., Sari-Minodier, I., Bottero, J.Y., Auffan, M., Perrin, J., 2015. Toxicity of nanoparticles on reproduction. *Gynécologie Obstétrique Fertilité* 43, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2014.11.014>.
- Hess, R.A., França, L.R., 2007. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, v. 636. Springer New York, pp. 1–15. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_1).
- Hinton, B.T., Setchell, B.P. (1993). Fluid secretion and movement. In *The Sertoli Cell* (L. D. Russell and M. D. Groszold, Eds.), pp. 249–267.
- Janevic, T., Kahn, L.G., Landsbergis, P., Cirillo, P.M., Cohn, B.A., Liu, X., Factor-Litvak, P., 2014. Effects of work and life stress on semen quality. *Fertil. Steril.* 102 (2), 530–538. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.021>.
- Jones, R.C., Dacheux, J.L., Nixon, B., Ercroft, H.W., 2007. Role of the epididymis in sperm competition. *Asian J. Androl.* 9 (4), 493–499. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00284.x>.
- Jouannet, P., Ducot, B., Feneux, D., Spira, A., 1988. Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int. J. Androl.* 11, 379–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1988.tb01011.x>.
- Kavamoto, E.T.; Barnabe, V.H.; Campos, B.E.S.De; Andradetalmelli, Ef (1999). Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 25, p. 61–66.
- Kermani-Alghoraishi, M., Anvari, M., Talebi, A.R., Amini-Rad, O., Ghahramani, R., Miresmaili, S.M., 2010. The effects of acrylamide on sperm parameters and membrane integrity of epididymal spermatozoa in mice. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 153, 52–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2010.07.008>.
- Kierszenbaum, A.L., 1994. Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocr. Rev.* 15 (1), 116–134. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-1-116>.
- King, W.W., Amant St, L.G., Lee, W.R., 1994. A technique for serial spermatozoa collection in mice. *Lab Anim. Sci.* 44, 295–296.
- Krause, W., Viethen, G., 1999. Quality assessment of computer assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. *Andrologia* 31 (3), 125–129.
- Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T.K., Bonde, J.P., Ernst, E., Hjøllund, N.H., Zhou, Y., Skakkebaek, N.E., Giwercman, A., 2000. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum. Reprod.* 15, 1562–1567. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1562>.
- Love, C.C., 1992. Semen collection techniques. *Vet. Clin. North Am. Equine Pr.* 8 (1), 111–128. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30470-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30470-4).
- Martinez, C.S., Escobar, A.G., Uranga-Ocio, J.A., Peçanha, F.M., Vassallo, D.V., Exley, C., Miguel, M., Wiggers, G.A., 2017. Aluminum exposure for 60days at human dietary levels impairs spermatogenesis and sperm quality in rats. *Reprod. Toxicol.* 73, 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.08.008>.
- Martinez, G., 2022. First-line Evaluation of Sperm Parameters in Mice (*Mus musculus*). *Bio Protoc.* 12 (20), e4529 <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4529>.
- Mathur, P., Rani, K., Bhatnagar, P., Flora, S.J.S., 2023. Incidence of morphological defects in sperm of mice exposed to hospital effluent. *Toxics* 11, 418. <https://doi.org/10.3390/toxics11050418>.
- Matsuoka, T., Imai, H., Fukui, Y., 2006. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 52 (5), 675–683. <https://doi.org/10.1262/jrd.18033>.
- Moretti, E., Capitani, S., Figura, N., Pammolli, A., Federico, M.G., Giannerini, V., Colodel, G., 2008. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26 (1), 47–56. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9283-5>.
- Morse, H.C.I., 2007. Building a better mouse: one hundred years of genetics and biology. In: Fox, J.G. (Ed.), *The Mouse in Biomedical Research*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50013-3>.
- Nabavi, N., Todehdehghan, F., Shiravi, A., 2013. Effect of caffeine on motility and vitality of sperm and in vivo fertilization of outbred mouse in T6 and M16 media. *Iran. J. Reprod. Med.* 11 (9), 741–746.
- Nantel, F., Monaco, L., Foulkes, N.S., Masquillier, D., LeMeur, M., Henriksen, K., Dierich, A., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., 1996. Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* 380 (6570), 159–162. <https://doi.org/10.1038/380159a0>.
- Nilsson, E., Larsen, G., Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C., Savenkova, M.I., Skinner, M.K., 2012. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian disease. *PLoS ONE* 7 (5), e36129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036129>.
- Oliveira, C.F., Lara, N.L., Lacerda, S.M., Resende, R.R., França, L.R., Avelar, G.F., 2020. Foxn1 and Prkd genes are important for testis function: evidence from nude and scid adult mice. *Cell Tissue Res.* 380, 615–625. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03165-w>.
- Padmalatha Rai, S., Vijayalaxmi, K.K., 2001. Tamoxifen citrate induced sperm shape abnormalities in the in vivo mouse. *Mutat. Res.* 492, 1–6. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00160-1).
- Pan, J., Goodheart, M., Chuma, S., Nakatsuji, N., Page, D.C., Wang, P.J., 2005. RNF17, a component of the mammalian germ cell nuage, is essential for spermiogenesis. *Development* 132 (18), 4029–4039. <https://doi.org/10.1242/dev.02003>.
- Perini A.P. (2007). Separação de espermatozoides "x" viáveis, de semen congelado, por gradiente descontínuo de densidade, na produção in vitro de embriões destinados a criopreservação. Dissertação UNESP.
- Rajender, S., Rahul, P., Mahdi, A.A., 2010. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion* 10 (5), 419–428. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.06.003>.
- Raposo, G., Marks, M.S., Cutler, D.F., 2007. Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 (4), 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.05.001>.
- Reid, B.L., Cleland, K.W., 1957. The structure and function of the epididymis. I. The histology of the rat epididymis. *Aust. J. Zool.* 5, 223–245. <https://doi.org/10.1071/Z09570223>.
- Risopatrón, J., Catalán, S., Miska, W., Schill, W.B., Sánchez, R., 2002. Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine

- spermatozoa incubates in vitro. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 347–351. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.t01-1-00380.x>.
- Robaire, B., Hermo, L., 1988. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions and their regulation. In: Knobil, E., Neill, J. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York.
- Sanabria, M., Cuciolo, M.S., Guerra, M.T., Dos Santos Borges, C., Banzato, T.P., Perobelli, J.E., Leite, G.A., Anselmo-Franci, J.A., De Grava Kempinas, W., 2016. Sperm quality and fertility in rats after prenatal exposure to low doses of TCDD: A three-generation study. *Reprod. Toxicol.* 65, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.06.019>.
- Shen, Y., Zhang, F., Li, F., Jiang, X., Yang, Y., Li, X., Li, W., Wang, X., Cheng, J., Liu, M., Zhang, X., Yuan, G., Pei, X., Cai, K., Hu, F., Sun, J., Yan, L., Tang, L., Jiang, C., Tu, W., Xu, J., Wu, H., Kong, W., Li, S., Wang, K., Sheng, K., Zhao, X., Yue, H., Yang, X., Xu, W., 2019. Loss-of-function mutations in QRICH2 cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. *Nat. Commun.* 10 (1), 433. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08182-x>.
- Smith, S.C., England, G.C., 2001. Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measures using computer aided sperm analysis, 515-159 J. *Reprod. Fertil. Suppl.* 57. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00171-7).
- Stewart, T.M., Liu, D.Y., Garret, C., Jørgensen, N., Brown, E.H., Bake, H.W.G., 2009. Associations between andrological measures, hormones and semen quality in fertile Australian men: inverse relationship between obesity and sperm output. *Hum. Reprod.* Volume 24 (Issue 7), 1561–1568. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep075>.
- Streit Jr, D.P., Sirol, R.N., Ribeiro, R.P., Moraes, G.V., Galo, J.M., Digmayer, M., 2008. Parâmetros qualitativos do sêmen de dourado (*Salminus maxillosus*) em cativeiro. *B. Inst. Pesca, São Paulo v.34* (3), 337–344.
- Tanaka, H., Baba, T., 2005. Gene expression in spermiogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* 62 (3), 344–354. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4394-y>.
- Tang, X.M., Lalli, M.F., Clermont, Y., 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *Am. J. Anat.* 163 (4), 283–294. <https://doi.org/10.1002/aja.1001630402>.
- Tartaglione, C.M., Ritta, M.N., 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62 (7), 1245–1252. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.012>.
- Tecirlioglu, R.T., Hayes, E.S., Trounson, A.O., 2002b. Semen collection from mice: electroejaculation. *Reprod. Fertil. Dev.* 14, 363–371. <https://doi.org/10.1071/rd0201>.
- Tecirlioglu, R.T., Lacham-Kaplan, O., Trounson, A.O., 2002a. Effects of electrical stimulation and seminal plasma on the motility of mouse sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 14 (8), 471. <https://doi.org/10.1071/rd02050>.
- Turek, P.J., 1997. Immunopathology and infertility. In: Lipshultz, L.I., Howards, S.S. (Eds.), *Infertility in the male*. Mosby-Year Book Inc, St. Louis, pp. 305–325. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511635656.017>.
- Wang, Y., Yamauchi, Y., Wang, Z., Zheng, H., Yanagimachi, R., Ward, M.A., Yan, W., 2020. Both cauda and caput epididymal sperm are capable of supporting full-term development in FVB and CD-1 mice. *Dev. Cell* 55 (6), 675–676. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.022>.
- Windhofer, L., Boersma, A., Dahlhoff, M., Rüllicke, T., Auer, K.E., 2023. The impact of percutaneous epididymal sperm aspiration on sperm quality in mice. *Reprod. Fertil.* 4 (2), e230017 <https://doi.org/10.1530/RAF-23-0017>.
- World Health Organization, 2021. *Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th ed.* World Health Organization, Geneva, pp. 119–124.
- World Health Organization, 2010. *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed.* WHO press, Geneva, p. 287.
- Wu, Y., Hu, X., Li, Z., Wang, M., Li, S., Wang, X., Lin, X., Liao, S., Zhang, Z., Feng, X., Wang, S., Cui, X., Wang, Y., Gao, F., Hess, R.A., Han, C., 2016. Transcription factor RFX2 is a key regulator of mouse spermiogenesis. *Sci. Rep.* 6, 20435 <https://doi.org/10.1038/srep20435>.
- Wyrobek, A.J., Bruce, W.R., 1975. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol.* 72 (No. 11), 4425–4429. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.11.4425>.
- Yamauchi, Y., Ajduk, A., Riel, J.M., Ward, M.A., 2007. Ejaculated and epididymal mouse spermatozoa are different in their susceptibility to nuclease-dependent DNA damage and in their nuclease activity. *Biol. Reprod.* 77, 636–647. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062406>.
- Yamauchi, Y., Ward, M.A., 2007. Preservation of ejaculated mouse spermatozoa from fertile C57BL/6 and infertile Hook1/Hook1 mice collected from the uteri of mated females. *Biol. Reprod.* 76, 1002–1008. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059881>.
- Yanagimachi, R., 1994. *Mammalian fertilization. The Physiology of Reproduction*. Raven, New York, pp. 189–317.
- Yonezawa, A., Yoshizumi, M., Ebiko, M., Amano, Y., Kimura, Y., Sakurada, S., 2005. Long-lasting effects of yohimbine on the ejaculated function in male dogs. *Biomed. Res.* 26 (5), 201–206. <https://doi.org/10.2220/biomedres.26.201>.
- Zhang, D., Penttilä, T.L., Morris, P.L., Teichmann, M., Roeder, R.G., 2001. Spermiogenesis deficiency in mice lacking the Trf2 gene. *Science* 292 (5519), 1153–1155. <https://doi.org/10.1126/science.1059188>.
- Zhou, D., Suzuki, T., Asami, M., Perry, A.C.F., 2019. Caput epididymal mouse sperm support full development. *Dev. Cell* 50 (1), 5–6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.012>.
- Zinaman, M.J., Brown, C.C., Selevan, S.G., Clegg, E.D., 2000. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J. Androl.* 21, 145–153. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03284.x>.