

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

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS**  
**(*Rattus norvegicus*) LOCALIZADAS NA REGIÃO DE TRANSIÇÃO**  
**ENTRE OS TÚBULOS SEMINÍFEROS E A *RETE TESTIS***

**MESTRANDO: ANDRÉ FELIPE DE FIGUEIREDO ALMEIDA**

**ORIENTADOR: GUILHERME MATTOS JARDIM COSTA**

**COORIENTADOR: LUIZ RENATO DE FRANÇA**

**Belo Horizonte**

**2015**

**André Felipe de Figueiredo Almeida**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS**

**(*Rattus norvegicus*) LOCALIZADAS NA REGIÃO DE TRANSIÇÃO**

**ENTRE OS TÚBULOS SEMINÍFEROS E A *RETE TESTIS***

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Guilherme Mattos Jardim Costa

Coorientador: Luiz Renato de França

**Belo Horizonte**

**2015**



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE**  
**ANDRÉ FELIPE DE FIGUEIREDO ALMEIDA**

264/2015/02  
entrada  
1º/2013  
2013669814

Às **quatorze horas** do dia **20 de fevereiro de 2015**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS (RATTUS NOVERGICUS) LOCALIZADAS NA REGIÃO DE TRANSIÇÃO ENTRE OS TÚBULOS SEMINIFEROS E A RETE TESTIS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa	UFMG	APROVADO
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	APROVADO
Dr. André Gustavo de Oliveira	UFMG	APROVADO
Dr. Luiz Renato de França	UFMG	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2015.**

Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa (Orientador) Guilherme Mattos Jardim Costa  
Dr. Gustavo Batista de Menezes [Assinatura]  
Dr. André Gustavo de Oliveira [Assinatura]  
Ph.D. Luiz Renato de França LUIZ RENATO DE FRANCA

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

**Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob a orientação do Prof. Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa e a coorientação do Prof. Dr. Luiz Renato de França, com o auxílio das seguintes instituições:**

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

Dedico este trabalho a minha mãe,  
Carmen Suely de Figueiredo Almeida

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Professor Luiz Renato de França, pela oportunidade a mim concedida e por toda confiança depositada em mim.

Especialmente, ao Professor Guilherme Mattos Jardim Costa, orientador e amigo, pelo conhecimento, aprendizagem contínua, conselhos, confiança e apoio.

Às Professoras Gleide Avelar e Samyra Lacerda, por todos ensinamentos, dedicação, paciência e apoio.

À Mara, técnica do Laboratório de Biologia Celular, e aos demais colegas do Laboratório de Biologia Celular, pelo conhecimento compartilhado, cooperação e ótima companhia. Em particular agradeço à Amanda Tavares, Bárbara Ramalho e Mariana Araújo.

À coordenação, professores, funcionários e amigos do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais.

Às agências financiadoras (CAPES, FAPEMIG e CNPq) pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

Principalmente, à minha mãe, Carmen, e segundas mães, Eny, Maria Celi e Helena, por todo apoio, incentivo, confiança e zelo contínuo.

Ao meu irmão Igor e cunhada Alessandra, meus primos Fabrício, Luiz e Vinícius, e demais familiares.

Aos amigos e colegas musicais Rodrigo, Mike, Gustavo e Ana.

Por fim, a todos que se envolveram e relacionaram de algum modo ou de outro nesta importante etapa.

*“Science is a way of life. Science is a perspective. Science is the process that takes us from confusion to understanding in a manner that’s precise, predictive and reliable - a transformation, for those lucky enough to experience it, that is empowering and emotional.*

*To be able to think through and grasp explanations – for everything from why the sky is blue to how life formed on earth – not because they are declared dogma but rather because they reveal patterns confirmed by experiment and observation is one of the most precious of human experiences”*

(Brian Greene)

## LISTA DE ABREVIATURAS

AR: Receptor de andrógeno

BrdU: Bromodeoxiuridina

CCR2: Motivo C-C receptor de quimiocina do tipo 2

Cx: Área adjacente à região de transição

DAB: Diaminobenzidina

GATA-4: Fator de transcrição; 4º membro da família de proteínas de ligação GATA

GDNF: Fator neurotrófico derivado de células da glia

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

FSH: Hormônio folículo estimulante

IGS: Índice gonadossomático

Ki-67: Marcador de proliferação celular MKi67

LH: Hormônio luteinizante

P27: Inibidor de quinase dependente de ciclina p27

PAS: Ácido periódico de Schiff

SC: Célula de Sertoli

ST: Túbulo seminífero

TR: Região de transição

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da distribuição do número total (20) de ratos Wistar utilizados nas diferentes abordagens experimentais.....	35
<b>Figura 2.</b> Atividade proliferativa das células de Sertoli de ratos Wistar avaliada pela marcação de <sup>3</sup> H-timidina (extraída de Orth, 1982).....	35
<b>Figura 3.</b> Imunomarcção para Ki-67 em testículo de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	37
<b>Figura 4.</b> Imunomarcção para BrdU em testículo de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	38
<b>Figura 5.</b> Imunomarcção para p27 em testículo de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	39
<b>Figura 6.</b> Imunomarcção para AR em testículo de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	41
<b>Figura 7.</b> Expressão Relativa de AR em células de Sertoli localizadas na TR, Cx e ST de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	42
<b>Figura 8.</b> Comparação temporal da expressão de AR em células de Sertoli localizadas na TR, Cx e ST de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	43
<b>Figura 9.</b> Imunomarcção para GATA-4 em testículo de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	45
<b>Figura 10.</b> Imunomarcção para CCR2 em células de Sertoli de testículo de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	47

<b>Figura 11.</b> Imunomarcção para CCR2 em espermatócitos primários de testículo de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	48
<b>Figura 12.</b> Dupla marcação para Ki-67 e AR em testículo de ratos Wistar pré-púberes.....	49
<b>Figura 13.</b> Dupla marcação para Ki-67 e AR em testículo de ratos Wistar sexualmente maduros.....	50
<b>Figura 14.</b> Diagrama esquemático sumarizando os resultados obtidos neste trabalho.....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Peso corporal e dados biométricos e morfométricos de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	52
<b>Tabela 2.</b> Lista dos fixadores utilizados.....	53
<b>Tabela 3.</b> Relação dos anticorpos, homologia com proteínas de rato, respectivas diluições, soros e fixadores utilizados no material biológico para a realização dos testes imunohistoquímicos.....	54
<b>Tabela 4.</b> Percentual de células de Sertoli positivas para os marcadores de proliferação, diferenciação e de interação com células do sistema imune, nas diferentes áreas do parênquima testicular avaliadas em ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros.....	55

## RESUMO

A região que conecta os túbulos seminíferos (ST) à *rete testis*, conhecida como região de transição (TR), é uma área do testículo que tem sido pouco investigada. Desta forma, sua caracterização e importância funcional para a espermatogênese, e mesmo para a função testicular como um todo, não estão ainda elucidadas. Particularmente, algumas características peculiares da TR, como a presença de células de Sertoli (SC) morfológicamente modificadas e os distintos aspectos imunomorfológicos dessa região e do interstício circundante, nos levaram a investigar se essas células são de fato fenotipicamente diferentes daquelas SC localizadas em outras áreas dos ST. Neste estudo, avaliamos parâmetros importantes relacionados à proliferação e diferenciação das SC, bem como a expressão do receptor de quimiocina CCR2 na TR e nos ST, incluindo-se a porção final dos ST que se conecta à TR, por nós denominada área adjacente à TR (Cx), em ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros. Por imunomarcações, a proliferação celular foi investigada através de Ki-67 e BrdU, enquanto a expressão de p27, GATA-4 e receptor de andrógeno (AR) foram estudadas a fim de se avaliar o status de diferenciação das SC. A expressão de CCR2 foi avaliada objetivando-se avaliar a interação entre as células do sistema imune e as SC. Ao contrário do que até então está estabelecido na literatura, na qual é considerado que as SC param de proliferar *in vivo* até o 21º dia de idade em ratos, encontramos SC localizadas na TR positivas para Ki-67 e para BrdU em ratos com 36 e 120 dias de idade. SC presentes na TR negativas para p27 também foram observadas em ambas as idades. Acerca do status de maturação das SC, em ambas as idades e diferentemente das SC localizadas nas outras áreas testiculares, observamos SC da TR não expressando AR ou GATA-4. Ademais, em geral há uma menor expressão de AR em SC presentes na TR em comparação à Cx e ST. Além disso, após o amadurecimento sexual, SC da TR apresentaram consideravelmente uma maior expressão de CCR2. A elevada expressão de CCR2 pode estar envolvida na indução da tolerância a auto-antígenos ou com a proliferação celular, como observado em câncer de próstata. Em conjunto, nossos dados sugerem um distinto comportamento (função) de SC localizadas na TR, bem como nos leva a hipotetizar a possível existência de uma subpopulação progenitora de SC nesta região.

**Palavras-chave:** Rato Wistar, testículo, região de transição, célula de Sertoli, proliferação, receptor de andrógeno, GATA-4, CCR2.

## ABSTRACT

The region that connects the seminiferous tubules (ST) to the rete testis, known as the transition region (TR) or transitional zone, is an area of the testis that has not yet been well characterized. Therefore, its morphofunctional importance for spermatogenesis and testis function as a whole is not yet completely understood. Particularly, the peculiar characteristics of the TR, such as the presence of morphologically modified Sertoli cells (SC) and the distinct immunomorphological aspects of this region, as well as the surrounding interstitium, motivated us to investigate if those cells are phenotypically different (i.e. express different factors or molecules) from SC located in other ST area. In the present study we have evaluated several important parameters related to the SC proliferation/differentiation and the expression of the monocyte chemo-attractant protein 1 receptor (CCR2) along the seminiferous tubules (ST), in the TR, and in the connection between ST and the TR (Cx) in prepubertal and adult Wistar rats. Using immunostaining, the cell proliferation was investigated through Ki-67 and BrdU, while p27, GATA-4, and androgen receptor (AR) expressions were studied in order to evaluate the SC differentiation status. CCR2 expression was assessed in order to evaluate the interaction between the immune cells and SC. Unlike what is established in the literature, in which is considered that SC stop proliferating in vivo at 2-3 weeks of age in rats, we found Ki-67 and BrdU positive SC at 36 and 120 days-old. However those mitotic SC were present only in the TR. Regarding the SC maturation, at both ages and different from the other areas, we observed SC located in the TR that did not express AR or GATA-4. Also, in comparison to the Cx and ST, in general a lower AR expression was found in SC located in the TR. Furthermore, in older rats, the SC present in the TR showed a higher CCR2 expression. This elevated CCR2 expression could be involved in the induction of self-antigens tolerance or with cell proliferation, as observed in prostate cancer. Taken together, these findings suggest a distinct behavior/function of SCs located in TR, leading us to hypothesize the presence of transiently amplifying SC subpopulation in this region.

**Keywords:** Wistar rats, testis, transition region, Sertoli cells, proliferation, androgen receptor, GATA-4, CCR2.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	1
1.1. Estrutura testicular em mamíferos.....	2
1.1.1. Células de Sertoli.....	3
1.1.2. Células de Leydig.....	6
1.2. Espermatogênese.....	7
1.3. Região de Transição.....	9
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	11
2.1. Justificativa.....	12
2.2. Objetivos.....	12
2.2.1. Objetivo geral.....	12
2.2.2. Objetivos específicos.....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
3.1. Animais experimentais.....	15
3.2. Processamento do material histológico.....	15
3.3. Análises biométricas e morfométricas.....	16
3.4. Regiões investigadas.....	16
3.5. Imunohistoquímica.....	17
3.6. Análise quantitativa.....	17
3.6.1. Quantificação de marcação.....	17
3.6.2. Quantificação de expressão.....	17
3.7. Imunofluorescência.....	19
3.8. Análise estatística.....	19
<b>4. RESULTADOS</b> .....	20
4.1. Biometria.....	21
4.2. Proliferação das células de Sertoli.....	21
4.3. Diferenciação das células de Sertoli.....	21
4.4. Expressão de CCR2.....	23
4.5. Imunofluorescência.....	23
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	32
<b>7. FIGURAS E TABELAS</b> .....	34
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56

# **1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

## 1. Introdução e Revisão de Literatura

### 1.1. Estrutura Testicular em Mamíferos

O testículo dos mamíferos eutérios é um órgão, cuja função é anfícrina – sendo responsável pela produção de gametas e pela biossíntese de andrógenos, com formato arredondado ou ovoide, localizado no escroto na maioria das espécies. O escroto propicia um microambiente capaz de regular a temperatura do testículo, cuja termorregulação ocorre, na grande maioria das espécies, através de vários mecanismos envolvendo vasos sanguíneos, músculo liso e esquelético, glândulas sudoríparas e pelos. Entretanto, em várias espécies este órgão se apresenta localizado no canal inguinal, na cavidade abdominal próximo à bexiga ou até mesmo aos rins (Setchell & Breed, 2006).

O testículo é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, a túnica albugínea, que emite trabéculas ou septos para o interior do órgão delimitando os lóbulos testiculares. Próximo à extremidade cranial do testículo localiza-se o funículo espermático, que contém artérias, vasos linfáticos, veias, nervos, músculo cremáster e o ducto deferente, que se origina na cauda do epidídimo, localizada próximo à extremidade caudata do testículo (Amann, 1981; Russell *et al.*, 1990). O parênquima testicular pode ser dividido morfofuncionalmente em dois compartimentos: o compartimento tubular e o intertubular.

O compartimento dos túbulos seminíferos ou tubular ocupa, na maioria dos mamíferos, entre 70 a 95% do parênquima testicular (Russell *et al.*, 1990; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). Os túbulos seminíferos se estendem em uma rede convoluta que se conecta por meio dos túbulos seminíferos retos (especificamente, pela região de transição) à *rete testis* localizada no mediastino testicular (França *et al.*, 2005), e são compostos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular. A túnica própria reveste externamente os túbulos seminíferos e é constituída de matriz extracelular e células peritubulares mioides – células contráteis que auxiliam na propulsão dos espermatozoides e do fluido testicular; o epitélio seminífero é composto por células germinativas em diferentes estágios de diferenciação e pelas células de Sertoli; e o lúmen tubular corresponde à região central dos túbulos e é resultante da secreção de fluido pelas células de Sertoli, sob a influência do FSH e principalmente

andrógenos. Esse fluido é responsável por carrear os espermatozoides recém-formados/espermiados, ainda imóveis, através de parte dos ductos excurrentes (*rete testis*, ductulos eferentes e ducto epididimário) (Russell *et al.*, 1990).

Acerca do compartimento intertubular, seus componentes são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de macrófagos, fibroblastos e mastócitos (Russell *et al.*, 1990). Embora exista entre as diversas espécies uma grande variação quanto à proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular, comumente a célula de Leydig é o tipo celular mais frequente neste compartimento (Fawcett *et al.*, 1973; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007).

#### **1.1.1. Células de Sertoli**

As células de Sertoli exercem papel crucial na espermatogênese e na estrutura dos túbulos seminíferos e, juntamente com as células peritubulares mioides, sintetizam a membrana basal que é fundamental para a integridade e função tubular (Dym, 1994). Ademais, devido a suas junções de oclusão, as células de Sertoli dividem o epitélio seminífero em compartimentos basal e adluminal (Russell & Griswold, 1993). No compartimento basal estão localizadas as espermatogônias e espermatócitos primários iniciais, enquanto no adluminal encontram-se os espermatócitos primários a partir de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Funcionalmente, as junções de oclusão compõem a barreira hematotesticular ou de células de Sertoli, que propicia um microambiente particular e imunoprivilegiado essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell *et al.*, 1990; Russell & Griswold, 1993; Yazama, 2008; Mital *et al.*, 2010; Meinhardt & Hedger, 2011; França *et al.*, 2011; França *et al.*, 2012; Domke *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014).

Durante o processo espermatogênico, as células de Sertoli e as células germinativas interagem física e funcionalmente de maneira bastante complexa (Kyrölahti *et al.*, 2011; Sugimoto *et al.*, 2012; Chen & Liu, 2014). Existem distintas formas de junções intercelulares entre esses dois tipos celulares, incluindo-se os desmosomos, complexos túbulos-bulbares, junções do tipo “gap” e junções à base de

actina, conhecidas como especializações ectoplasmáticas (Russell & Griswold, 1993; Kopera *et al.*, 2010). Estas últimas parecem impedir a descamação (*sloughing*) de células germinativas do epitélio seminífero, evitando assim a infertilidade. Particularmente, as junções semelhantes a desmossomos e as especializações ectoplasmáticas da porção basal do epitélio seminífero coexistem ao nível da barreira hematotesticular, onde as mesmas auxiliam as junções de oclusão na manutenção da barreira imunológica (Kopera *et al.*, 2010; França *et al.*, 2011; França *et al.*, 2012). De modo geral, evidencia-se a necessidade da interação parácrina das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, Leydig e peritubulares mioides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Russell *et al.*, 1994; França & Russell, 1998; Welsh *et al.*, 2009; Rossi & Dolci, 2013; Rebourcet *et al.*, 2014). A integridade funcional da membrana basal elaborada pelas células de Sertoli e peritubulares mioides é também fundamental para o processo espermatogênico (Dym, 1994).

Nos testículos de animais sexualmente maduros, é considerado que as células de Sertoli estão completamente diferenciadas. A considerável variação na forma e estrutura da célula de Sertoli durante o ciclo do epitélio seminífero demonstra o alto grau de plasticidade desta célula, o que reflete as alterações morfofuncionais que ocorrem nas células germinativas (Russell *et al.*, 1993; Sugimoto *et al.*, 2012). Além da composição da barreira de células de Sertoli, anteriormente citado, as células de Sertoli realizam outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas, dentre as quais podem ser mencionadas: o fornecimento de nutrientes e diversos outros fatores para as células germinativas, bem como a própria sustentação para essas células espermatogênicas; participação ativa no processo de liberação (espermição) das espermátides para o lúmen tubular; fagocitose tanto do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da liberação das células espermiadas, quanto de células germinativas que sofrem apoptose (Griswold, 1998; Hess & França, 2007, Sofikitis *et al.*, 2008). Conforme também já foi dito, as células de Sertoli secretam ainda fluido em direção ao lúmen tubular, o qual possui substâncias e inúmeros fatores importantes para a função epididimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozoides (Griswold, 1988; Robaire & Viger,

1995). A secreção de fluido também ocorre em direção ao compartimento intertubular, estando assim envolvida com mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo, tais como as células peritubulares mioides, de Leydig e musculares lisas dos vasos. A célula de Sertoli faz ainda a intermediação hormonal do processo espermatogênico apresentando, dentre outros, receptores de andrógenos e de FSH (Russell et al., 1990; Russell & Griswold, 1993; Sharpe, 1994; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). Além disso, a célula de Sertoli é considerada como o principal componente do nicho espermatogonial, que é definido como o microambiente específico que regula o controle da auto-renovação, diferenciação e mesmo apoptose das espermatogônias-tronco (Voog & Jones, 2010; Oatley & Brinster, 2012; De Rooij & Griswold, 2012; Yoshida, 2012; Iwamori, 2014), sendo composto pelas próprias células-tronco, células somáticas adjacentes e matriz extracelular (Hofmann, 2008; Caires *et al.*, 2010; Spinnler *et al.*, 2010; Oatley & Brinster, 2012). Por estarem em íntimo contato com as células germinativas, as células de Sertoli, além de oferecer o suporte cito-arquitetural importante na manutenção do nicho, atuam fundamentalmente através da sinalização por GDNF – que é um fator essencial para a proliferação e auto-renovação espermatogonial (Hofmann *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Hofmann 2008; Kokkinaki *et al.*, 2009; Nakagawa *et al.*, 2010; Campos-Júnior *et al.*, 2012; Chen & Liu, 2014; Song & Wilkinson, 2014).

Diversos estudos demonstram que o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da magnitude da produção espermática e do tamanho do testículo (Hess *et al.*, 1993; Sharpe, 1994; França *et al.*, 1995; Hess & França, 2007), tendo por fundamento o fato de que as células de Sertoli tem capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa para cada espécie, e que, teoricamente, a população desse tipo celular se mantém estável após a puberdade (França & Russell, 1998; Sharpe *et al.*, 2003; Hayrabedian *et al.*, 2012; Tarulli *et al.*, 2012), tampouco havendo alteração no seu número ao longo dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero (Wing & Chistensen, 1982). Uma maior população de células de Sertoli oferece maior suporte às espermatogônias, resultando em aumento do número das células germinativas (França *et al.*, 1995; Auharek & França, 2010). Desta forma, como estabelecido na literatura, o número de

células de Sertoli definido durante o desenvolvimento testicular, no período que antecede a puberdade, determina em última análise o tamanho do testículo e a magnitude da produção espermática no indivíduo adulto (Hess *et al.*, 1993; Sharpe, 1994; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007).

Embora esta premissa esteja sendo revista para mamíferos em geral (Hayrabedian *et al.*, 2012; Tarulli *et al.*, 2012; Tarulli *et al.*, 2013), considera-se, em ratos e camundongos, que as células de Sertoli proliferam mais ativamente durante a fase fetal, ocorrendo um pico de proliferação das mesmas antes do nascimento (Orth, 1984; Orth *et al.*, 1988; Orth, 1993). Após o nascimento, está estabelecido nesses roedores que a proliferação das células de Sertoli se estende por 2 a 3 semanas, reduzindo de forma gradual até o início da proliferação de espermatócitos primários. Assim, considera-se que por volta do 21º dia pós-natal em ratos não mais ocorrem divisões das células de Sertoli (Steinberger & Steinberger, 1971; Orth, 1982; Vergouwen *et al.*, 1991; Joyce *et al.*, 1993, Auharek, 2007; Auharek & França, 2010) (Fig. 1). Daí em diante, o número de células de Sertoli por testículo é considerado estável por toda a vida do animal (França *et al.*, 2005; Hayrabedian *et al.*, 2012). Sabe-se que o hormônio folículo estimulante (FSH) desempenha importante papel na regulação da proliferação das células de Sertoli (Orth, 1984, 1988, 1993; Heckert & Griswold, 2002; Meachem *et al.*, 2005). No entanto, vários estudos sugerem – dentre outros fatores como activina A (Nicholls *et al.*, 2012) – que andrógenos e estrógenos também influenciam essa proliferação (Orth, 1984, 1993; Sharpe *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2004; Atanassova *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2007, 2008; Auharek *et al.*, 2010, 2011, 2012; Lucas *et al.*, 2014). Em contrapartida, os hormônios tireoidianos atuam (principalmente através do inibidor de ciclina, p27) de forma marcante na transição do estado mitótico para o não-mitótico (maturação/diferenciação) das células de Sertoli antes da puberdade (Cooke *et al.*, 1994; França *et al.*, 1995; Cooke *et al.*, 2005; Auharek & França, 2010; Chatonnet *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015).

### **1.1.2. Células de Leydig**

As células de Leydig são a principal fonte de andrógenos (Smith & Walker, 2014), sintetizados a partir do colesterol (Bardin, 1996) e sob a estimulação exercida

pelo hormônio luteinizante (LH) em receptores localizados na membrana citoplasmática dessas células. Similarmente ao FSH, o LH é uma glicoproteína sintetizada e secretada pela adenohipófise sob a influência do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) proveniente do hipotálamo. Nos testículos, existem receptores para andrógenos nas células de Sertoli, células peritubulares mióides, musculares lisas dos vasos e na própria célula de Leydig (Suárez-Quian *et al.*, 1999).

Dentre os andrógenos produzidos pelas células de Leydig incluem-se a testosterona e a diidrotestosterona, os quais são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelleniemi *et al.*, 1996; Teerds & Keijer, 2014), bem como pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e pela manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin *et al.*, 1994; De Gendt *et al.*, 2004; O'Hara *et al.*, 2014). Especificamente, a diidrotestosterona é considerada o principal andrógeno responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Fan & Robaire, 1998; Goyal *et al.*, 1999). Atualmente é reconhecida também a relevância destas células de Leydig na morfogênese gonadal e também no descenso testicular (Virtanen & Toppari, 2014), principalmente através da secreção de fatores como a activina A (Archambeault & Yao, 2010), o peptídeo semelhante à insulina 3 (Insl-3) (Kubota *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2010) e mesmo os andrógenos (Chen *et al.*, 2010).

## **1.2. Espermatogênese**

A espermatogênese é um processo cíclico, organizado e bem coordenado, que ocorre no interior dos túbulos seminíferos, no qual as espermatogônias diploides (células-tronco germinativas responsáveis por manter o processo espermatogênico e a homeostase testicular) se diferenciam gradualmente em espermatócitos, espermatídes e espermatozoides (De Rooij & Russell, 2000; De Rooij & Griswold, 2012; Kanatsu-Shinohara & Shinohara, 2013; Yang & Oatley, 2014). Na maioria das espécies de mamíferos eutérios já investigados (França & Russell, 1998) a espermatogênese dura de 40 a 60 dias e, baseado em características morfológicas e funcionais, este

processo pode ser dividido em três etapas ou fases: fase espermatogonial ou mitótica, fase espermatocitária ou meiótica e fase espermiogênica ou de diferenciação (Russell *et al.*, 1990; Sharpe, 1994; França *et al.*, 1998; Hess & França, 2007). Acredita-se que o ácido retinoico, metabólito ativo da vitamina A, seja um importante fator no processo de diferenciação das espermatogônias (Sugimoto *et al.*, 2012; Rossi & Dolci, 2013; Mark *et al.*, 2015) e também para que essas três fases ocorram adequadamente e de forma sincronizada, desde o início do desenvolvimento pós-natal do testículo, sob o controle da célula de Sertoli (Hogarth & Griswold, 2012).

A fase espermatogonial é caracterizada pela auto-renovação e diferenciação das espermatogônias-tronco; nesta etapa ocorrem sucessivas divisões mitóticas na qual são geradas células “amplificadoras e/ou progenitoras” e células comprometidas com a diferenciação. Estas células mais diferenciadas dão continuidade ao processo espermatogênico, por meio de um intrincado processo de diferenciação e proliferação, até a última divisão mitótica, que origina os espermatócitos primários (pré-leptotenos) iniciando, assim, a fase espermatocitária (De Rooij & Grootegoed, 1998; De Rooij & Russell, 2000; De Rooij & Van Pelt, 2003; Phillips *et al.*, 2010; Nakagawa *et al.*, 2010; De Rooij & Griswold, 2012; Yoshida, 2012). Nessa etapa, importante para a variabilidade genética entre indivíduos de uma mesma espécie, ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e a segregação dos cromossomos homólogos. Esta fase também é conhecida como prófase I e pode ser subdividida em pré-leptoteno/leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Ao término da primeira divisão meiótica (reducional), são formados os espermatócitos secundários que, após a segunda divisão meiótica (equacional), dão origem às espermátides arredondadas. Tem-se, dessa forma, o início da terceira etapa, fase espermiogênica, na qual ocorre um complexo processo de diferenciação, que envolve a formação do acrossomo e do flagelo, a compactação do DNA (substituição das histonas por protaminas) e o alongamento progressivo das espermátides, culminando na formação dos espermatozoides (Russell *et al.*, 1990; Hess & França, 2007).

### **1.3. Região de Transição**

Conforme brevemente mencionado (item 1.1), a região de transição compreende a porção terminal dos túbulos seminíferos que se conecta com a *rete testis* (Perey *et al.*, 1961; Roosen-Runge, 1961). Nessa região, na qual se verifica a presença de raras células germinativas (espermatogônias e eventuais espermátócitos), há predominância de células de Sertoli consideradas modificadas (Dym, 1974; Nykänen, 1979; Hermo & Dworkin, 1988). Estas células de Sertoli, com aspecto colunar, orientam-se em direção à membrana basal e seus ápices convergem distalmente em direção à *rete testis*. Assim, essa configuração faz com que o lúmen dessa região fique bastante diminuído, funcionando como uma espécie de válvula, de modo a prevenir ou dificultar o refluxo de fluido e/ou células da *rete testis* para o lúmen tubular (Perey *et al.*, 1961; Roosen-Runge, 1961; Hermo & Dworkin, 1988). As células de Sertoli dessa região são consideradas modificadas por apresentarem distintas características, quando comparadas com as células de Sertoli localizadas ao longo dos túbulos seminíferos. É citado na literatura que essas células apresentam intensa atividade de endocitose, a qual seria capaz de regular e modificar a composição do fluido testicular (Osman & Ploen, 1978; Hermo & Dworkin, 1988). Também é considerado que as mesmas exibem estruturas lisossômicas como parte de sua maquinaria celular e junções de oclusão luminiais, em comparação com as demais células de Sertoli dos túbulos seminíferos que apresentam junções de oclusão basais (Nykänen, 1979; Hermo & Dworkin, 1988).

Particularidades histoquímicas também foram demonstradas na região de transição, sendo encontrada uma grande concentração de fosfatase alcalina e PAS (Osman, 1984). Esses achados sugerem maior permeabilidade dessa área em relação ao restante dos túbulos seminíferos. No entanto, quando o lantânio foi utilizado como traçador para se averiguar a permeabilidade da barreira de célula de Sertoli (hematotesticular) nessa área, diferenças funcionais não foram encontradas (Osman, 1984). Pelo fato de maior concentração de glicogênio também ter sido encontrada na região de transição, foi hipotetizado que esse achado poderia ser devido ao maior armazenamento de energia em decorrência do não desenvolvimento da espermatogênese nessa região. Alternativamente, essa maior concentração de

glicogênio estaria envolvida na secreção de fluido rico em carboidratos para fornecer energia aos espermatozoides que por esse local transitam (Osman, 1984). Em contrapartida, uma menor concentração de gotas lipídicas foi encontrada nas células de Sertoli nessa região, fazendo crer que a atividade metabólica das células de Sertoli na região de transição seja menor, particularmente pelo fato dessas estruturas estarem relacionadas com a atividade metabólica das células de Sertoli (Osman, 1984). Conforme pode ser notado através da literatura citada nestes dois últimos parágrafos, os dados existentes para esta particular região dos túbulos seminíferos são, de certa forma, bastante especulativos.

Do ponto de vista imunológico, em comparação com as demais regiões dos túbulos seminíferos, uma maior prevalência de linfócitos e macrófagos foi observada circundando a região de transição (Takahashi *et al.*, 2006). O fato de maior quantidade de linfócitos estarem presentes ao redor dessa região sugere que esta seja um local onde os linfócitos autorreativos possam ter acesso a antígenos de células germinativas, uma vez que há indícios que na região de transição a barreira de células de Sertoli possa ser funcionalmente mais vulnerável (Osman, 1984).

## **2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## **2. Justificativa e Objetivos**

### **2.1. Justificativa**

Até o presente momento, a região de transição foi alvo de poucos estudos, os quais são, em grande parte, morfológicos e descritivos. Assim, a sua caracterização e importância funcional para a espermatogênese, e mesmo para a função testicular como um todo, não estão ainda totalmente elucidadas. Conforme já foi mencionado, algumas características peculiares da região de transição, tais como a presença de células de Sertoli consideradas modificadas, pequena quantidade de células germinativas e maior concentração de macrófagos e linfócitos ao redor da mesma tornam essa área um interessante alvo para investigações mais pormenorizadas acerca de importantes eventos morfofuncionais como a regulação da proliferação das células de Sertoli e a interação destas com as células do sistema imune. Deve ser também ressaltado que estudos preliminares em nosso laboratório sugeriram que as células de Sertoli na região de transição em ratos proliferavam por um período mais longo (isto é, acima de três semanas) do que ocorre usualmente nas outras áreas do parênquima testicular. Assim, a investigação de fatores ou características moleculares das células de Sertoli na região de transição pode fornecer importantes subsídios que auxiliem na melhor compreensão de sua própria fisiologia, proliferação e diferenciação, além das interações entre essas células somáticas e as células germinativas.

### **2.2. Objetivos**

#### **2.2.1. Objetivo Geral**

Avaliar características morfofuncionais das células de Sertoli, de modo a investigar se essas células presentes na região de transição entre túbulos seminíferos e *rete testis*, e consideradas modificadas, são de fato fenotipicamente diferentes (isto é, expressam diferentes fatores ou moléculas) daquelas localizadas em outras áreas dos túbulos seminíferos através de análises morfométricas, estereológicas e imunohistoquímicas, em ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros. Neste sentido, as seguintes áreas foram investigadas: i) região de transição; ii) porção final

dos túbulos seminíferos que se conecta à região de transição, denominada área adjacente à região de transição; e iii) área ao longo dos túbulos seminíferos.

### **2.2.2. Objetivos Específicos**

- Investigar o status de proliferação das células de Sertoli através dos marcadores proliferativos Ki67 e BrdU.
- Investigar o status de diferenciação das células de Sertoli através da marcação por p27 e da expressão de receptores de andrógenos (AR) e de GATA-4.
- Avaliar a correspondência entre o status de proliferação (através do marcador Ki-67) com o de diferenciação (pela expressão de AR) das células de Sertoli por duplas marcações.
- Investigar a expressão de CCR2 nos diferentes tipos de células testiculares.

# **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Animais Experimentais

Foram utilizados no total 20 ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar; metade desses ratos era pré-púberes, com 36 dias de idade, e a outra metade sexualmente madura, com 120 dias de idade ao sacrifício. Desses animais, 4 (sendo 2 pré-púberes e 2 sexualmente maduros) receberam injeção intra-peritoneal de bromodeoxiuridina (BrdU) (Fig. 2). Esses animais, procedentes do Centro de Bioterismo (Cebio) do ICB/UFMG, foram mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Celular, e todos os procedimentos adotados foram de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais – CETEA/UFMG (Protocolo de número 398/2013).

#### 3.2. Processamento do Material Histológico

Os animais utilizados foram todos pesados e sacrificados por overdose de pentobarbital (50 mg/Kg peso corporal). Os quatro ratos (2 animais pré-púberes e 2 sexualmente maduros) destinados às análises de proliferação de células de Sertoli pela marcação com bromodeoxiuridina (BrdU) receberam, 2 horas antes do sacrifício, injeção intraperitoneal de solução de BrdU (150mg de BrdU/Kg de animal). Em seguida, os testículos foram retirados, pesados (Tab. 1), e fragmentos dos mesmos com cerca de 4 mm de espessura, coletados próximos à região da *rete testis*, foram mantidos imersos em fixador por 24 horas. O tipo de fixador, bem como a temperatura mantida durante a fixação, variou conforme o propósito destinado (Tab. 2). Após a fixação, esses fragmentos foram recortados em fragmentos ainda menores, de 1 a 2 mm de espessura, e mantidos em álcool 70% até o momento da inclusão. Para esse procedimento, foi realizada a desidratação dos fragmentos testiculares em concentrações crescentes de álcool etílico em água destilada (70%, 80%, 95% e 100%), que foram por fim diafanizados em xilol, incluídos em Paraplast® (Merck). Cortes histológicos de 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo Leica RM 2165.

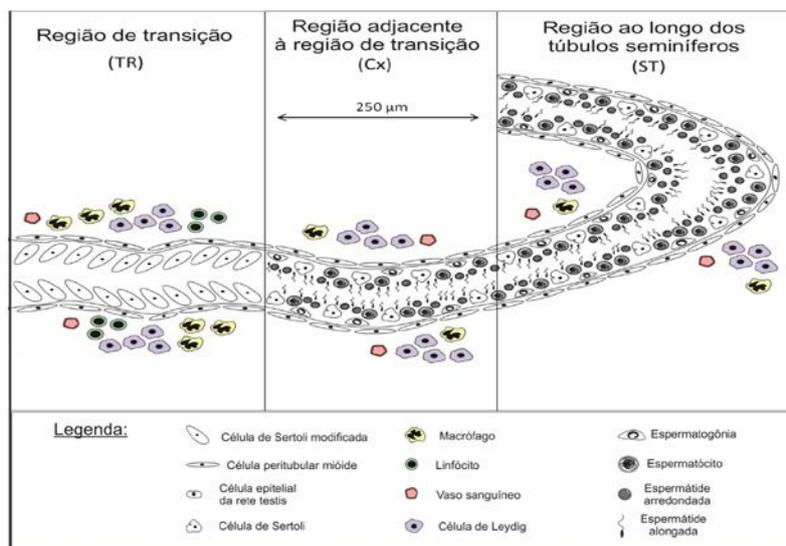
### 3.3. Análises Biométricas e Morfométricas

Para o cálculo do índice gonadossomático (IGS), que representa o percentual das gônadas em relação ao peso corporal, foi aplicada a seguinte fórmula por indivíduo:  $IGS = Wg/Wt \times 100$ , onde  $Wg$  = peso das gônadas e  $Wt$  = peso corporal.

A fim de melhor caracterizar os grupos avaliados neste estudo, o diâmetro tubular médio e a altura média do epitélio seminífero por animal foram calculados a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Essas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero e foram realizadas utilizando-se régua micrométrica adaptada a uma ocular de 10x, em aumento de 400x.

### 3.4. Regiões Investigadas

Conforme mencionado no item 2.2, neste estudo avaliamos características morfofuncionais das células de Sertoli presentes na região de transição (TR), na área adjacente à região de transição (Cx) e ao longo dos túbulos seminíferos (ST). O esquema a seguir ilustra essas regiões investigadas. Definimos, arbitrariamente, a extensão da Cx equivalente à medida de um diâmetro tubular, ou seja, aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ . A partir desta distância para a TR, as análises foram feitas considerando como áreas de ST.



### **3.5. Imunohistoquímica**

As secções histológicas destinadas à imunohistoquímica foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da incubação dos cortes com solução de água oxigenada ( $H_2O_2$  em metanol; 0,6%), por 30 minutos. A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se tampão citrato (pH 6,0) em microondas, com potência máxima, por cinco minutos a partir da ebulição. Após o resfriamento, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da avidina e biotina (Kit de Bloqueio Avidina/Biotina, Vector Laboratories), por 15 minutos cada. Posteriormente, as secções histológicas foram incubadas em soro para o bloqueio de ligações inespecíficas e, subsequentemente, incubadas com o anticorpo primário “overnight” a 4°C. Foram utilizados anticorpos para Ki-67, BrdU, p27, receptor de andrógeno (AR), GATA-4 e CCR2 (Tab. 3). Na sequência, as lâminas foram lavadas em tampão e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Tab. 3) por uma hora e, em seguida, com solução ABC (Vectastain® ABC, Vector Laboratories) por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e os cortes contra-corados com Hematoxilina de Mayer.

### **3.6. Análise Quantitativa**

#### **3.6.1. Quantificação de Marcação**

Para os marcadores Ki-67, AR, GATA-4, CCR2, o percentual de células de Sertoli positivas e negativas em cada uma das regiões avaliadas (TR, Cx e ST) foi calculado. Para isso, uma área de 50 mil  $\mu m^2$  de cada uma dessas regiões foi analisada por indivíduo. Esta área foi assim determinada através de análises estatísticas, pelas quais se revelou que, a partir de uma área de 30 mil  $\mu m^2$  por região, os dados se apresentavam estáveis (estatisticamente semelhantes). Considerando-se uma maior margem de segurança, uma área por região ainda maior foi avaliada.

#### **3.6.2. Quantificação de Expressão**

A fim de se quantificar a expressão do AR nas células de Sertoli em cada uma das regiões avaliadas (TR, Cx e ST), imagens do parênquima testicular contemplando

todas essas regiões foram obtidas em microscópio Olympus BX60, acoplado à câmera fotográfica e adquiridas com resolução de 2576 x 1932 pixels (300dpi). Por meio do programa *Photoshop CS3 v10.0*, as imagens foram convertidas em escala de cinza e, subsequentemente, as cores foram invertidas. A seguir, as imagens foram analisadas utilizando o software de análise de imagens *Image J (Image Processing and Analysis in Java, v1.45s)*, mensurando-se 60 células de cada região em cada indivíduo (Lara, 2014; Oliveira, 2014).

Na região ST dos indivíduos pré-púberes, foram levadas em consideração apenas células de Sertoli presentes em túbulos seminíferos que i) apresentavam espermatócitos primários em diplóteno no compartimento adluminal e zigóteno no compartimento basal (correspondente ao estágio XIII caracterizado conforme o método do sistema acrossômico) e que ii) apresentavam espermatócitos primários em paquítenos no compartimento adluminal e pré-leptóteno no compartimento basal (correspondente ao estágio VII também caracterizado de acordo com o método do sistema acrossômico). Já para os adultos, levaram-se em consideração células de Sertoli presentes em túbulos seminíferos i) nos estádios IX-XIII e ii) no estágio VII (conforme o sistema acrossômico de classificação); estádios nos quais é observada uma menor e uma maior expressão de AR respectivamente, tendo em vista que a expressão de AR no testículo é estágio-dependente (Bremner *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 2004; Walker & Cheng, 2005; O'Donnell *et al.*, 2006).

Os núcleos de células de Sertoli expressando a proteína de interesse foram então demarcados e a intensidade de pixels determinada segundo o histograma. Para se excluir a variação de *background*, mediu-se a intensidade de pixels de uma região sem células (lúmen de túbulo seminífero ou vaso sanguíneo) em cada imagem, e esse valor foi subtraído do valor obtido para cada célula da mesma imagem (Lara, 2014; Oliveira, 2014). Por fim, para se averiguar a diferença de expressão entre as diferentes regiões de um mesmo grupo de idade e entre as diferentes idades, os dados relativos de intensidade de marcação obtidos na TR, na Cx e na região ST nos estádios IX-XIII e no estágio VII foram comparados considerando a região ST no estágio VII como controle.

### **3.7. Imunofluorescência**

Nas análises de imunofluorescência, secções histológicas de amostras fixadas em metacarn foram desidratadas e submetidas à recuperação antigênica e bloqueio de ligações inespecíficas conforme previamente descrito (item 3.4). Em seguida, foi realizada a incubação com anticorpos primários “overnight” a 4°C. Com o intuito de se avaliar a correspondência entre o status de proliferação e o de diferenciação das células de Sertoli, foi feita dupla marcação utilizando anticorpos para Ki-67 (*PharMingen*, #558615; diluição 1:50) e AR (*Santa Cruz*, sc-816; diluição 1:50). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão e incubadas com anticorpo secundário AlexaFluor [633 anti-mouse (1:200) e 488 anti-rabbit (1:200)] por uma hora à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão, as lâminas foram montadas com solução de Mowiol 4-88 (Merck). O controle negativo da imunofluorescência foi realizado substituindo-se o anticorpo primário por TBS (omissão do anticorpo primário). Após essa etapa, as lâminas foram analisadas para se investigar os tipos celulares marcados nas diferentes regiões testiculares investigadas.

### **3.8. Análise Estatística**

Todos os dados quantitativos foram testados quanto à normalidade e homoscedasticidade das variâncias pelos testes *Kolmogorov-Smirnov* (*Dallal-Wilkinson-Lilliefors*) e *Bartlett*, respectivamente. Em caso de distribuição normal, os parâmetros foram submetidos à análise de variância (*One-way ANOVA*) e as médias comparadas pelo teste *Newman-Keuls*. Já para os dados não-paramétricos, foi aplicado o teste *Kruskal-Wallis* para a análise de variância, seguido do teste *Dunns* para a comparação das médias. Para a avaliação longitudinal, ou seja, comparação entre os dados do indivíduo pré-púbere e do indivíduo sexualmente maduro de uma mesma região, foi aplicado o Teste-T. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prisma 5* (GraphPad Software, Inc), e o nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

## 4. Resultados

### 4.1. Biometria

As médias dos pesos corporais e testiculares, bem como do índice gonadossomático de ambos os grupos avaliados (pré-púbere e sexualmente maduro) estão expressos na Tab. 1. Além disso, medidas morfométricas testiculares, incluindo-se o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero, podem também ser observadas na mesma tabela. Conforme seria de se esperar, todos os valores encontrados foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) nos ratos Wistar sexualmente maduros.

### 4.2. Proliferação das Células de Sertoli

SCs apresentando atividade proliferativa foram encontradas na TR em ratos pré-púberes, bem como naqueles sexualmente maduros. Pela análise quantitativa da marcação de Ki-67 (Fig. 3), foi observado que cerca de 4% (4,26%) das SCs estavam proliferando na TR em animais pré-púberes. Embora esse número apresente-se significativamente reduzido ( $p < 0,05$ ), em ratos adultos as SCs ainda apresentavam-se em proliferação (~1%). Já nas outras regiões analisadas (Cx e ST) nenhuma célula de Sertoli foi encontrada proliferando (Fig. 3I).

Embora pequeno número de ratos tenha sido avaliado, padrão semelhante foi observado nas análises utilizando-se BrdU. Ou seja, apenas SCs localizadas na TR foram encontradas proliferando, tanto em ratos jovens quanto naqueles adultos (Fig. 4). Interessantemente, em um dos indivíduos jovens foi observado um grupo de células de Sertoli com atividade mitótica na TR (Fig. 4B).

### 4.3. Diferenciação das Células de Sertoli

- **P27**

Na imunomarcação para p27, proteína que medeia a interrupção do ciclo celular, caracteristicamente expressa em células que não mais sofrem proliferação, padrão equivalente aos marcadores de proliferação foi também obtido. Assim, na TR, foram observadas SCs negativas para p27 em ratos jovens e, apesar de não terem sido

feitas análises quantitativas, poucas SCs negativas para este importante marcador foi notada nos ratos adultos (Fig. 5).

- **AR**

SCs negativas para a marcação de AR e localizadas na TR foi um achado relativamente frequente em ratos pré-púberes (Fig. 6). Assim, quase um quinto dessas células (~17%) não estavam expressando AR. Conforme pode ser notado na mesma figura, esse número apresentou-se reduzido ( $p < 0,05$ ) praticamente pela metade (~9%) em ratos adultos. Já na Cx, algumas poucas células de Sertoli foram encontradas também negativas para este marcador em questão em ambos os grupos investigados, sendo esta ocorrência inferior a 1%. Em contraste, em outras áreas ao longo dos ST as células de Sertoli avaliadas normalmente expressavam AR (Fig. 6I).

Comparando-se as diferentes áreas investigadas, observamos que tanto nos animais pré-púberes quanto naqueles adultos a expressão relativa de AR apresenta padrão similar (Fig. 7). Na TR, a expressão de AR foi semelhante aos estádios do ciclo do epitélio nos quais esta expressão apresentava-se menor ( $p < 0,05$ ), sendo, no entanto, significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que aquele (estádio VII) em que a expressão era maior. Por outro lado, quando as diferentes idades foram comparadas, observamos que a expressão de AR aumenta significativamente na TR e na Cx ( $p < 0,05$ ) (Fig. 8), entretanto, nenhuma variação significativa nesta expressão foi notada para os diferentes estádios (VII e IX-XIII) avaliados (Fig. 8) ao longo dos ST.

- **GATA-4**

Na avaliação imunohistoquímica para GATA-4 observamos que algumas SCs presentes na TR também não expressam esse fator de transcrição. A análise quantitativa desta marcação (Fig. 9) nos revelou que em ratos pré-púberes o valor encontrado foi da ordem de aproximadamente 8%, enquanto nos adultos esse valor reduziu significativamente em aproximadamente a metade ( $p < 0,05$ ). Na Cx, foram ainda encontradas algumas SCs negativas para GATA-4, valor este inferior a 1% tanto em ratos pré-púberes quanto naqueles adultos. Já ao longo dos ST, todas as SCs foram observadas expressando GATA-4 (Fig. 9I).

#### 4.4. Expressão de CCR2

Ao realizar imunohistoquímica para CCR2 (Fig. 10), observamos que somente as SCs localizadas na TR e na área adjacente à TR (Cx) expressam esse receptor. Assim, nos animais pré-púberes cerca de 10% das SCs presentes na TR foram positivas para esse marcador. Com a maturidade sexual, esse número aumentou consideravelmente de modo a compreender mais de 90% das SCs na TR dos ratos Wistar adultos (Fig. 10I). Notamos ainda aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de SCs expressando CCR2 na Cx nos ratos sexualmente maduros. Desta forma, aproximadamente 2% e 5% de SCs positivas foram observadas respectivamente nos animais jovens e adultos (Fig. 10I). Também foram observados espermatócitos primários em paquíteno expressando esse receptor em seus citoplasma e membrana citoplasmática (Fig. 11) na Cx e ao longo dos ST, tanto em ratos pré-púberes quanto naqueles sexualmente maduros.

#### 4.4. Imunofluorescência

- **AR – Ki-67**

Ao realizar a dupla marcação para Ki-67 e AR observamos um padrão característico para as SCs localizadas na TR, tanto nos ratos jovens (Fig. 12) quanto naqueles adultos (Fig. 13), onde normalmente as SCs positivas para AR são negativas para Ki-67. Característica esta também observada na Cx e ao longo dos ST (Fig. 12C e F; Fig. 13C e F). Ainda, SCs Ki-67 positivas e AR negativas foram notadas na TR (Fig. 12C e F; Fig. 13C e F). Interessantemente, células peritubulares mioides na TR (Fig. 12C) e células epiteliais da *rete testis* (Fig. 13 C) proliferando (Ki-67 e AR positivas) foram observadas.

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. Discussão

Até o presente momento, está estabelecido na literatura que o período de proliferação pós-natal das células de Sertoli se estende até o momento coincidente com intensa proliferação de espermatócitos primários, formação da barreira de células de Sertoli (hematotesticular) e secreção de fluido tubular (Russel *et al.*, 1989). Eventos estes que em ratos ocorrem entre a segunda e a terceira semana pós-natal (Orth, 1982; Johson *et al.*, 1996; Auharek, 2007; Cheng & Mruk, 2009; Auharek & França, 2010), e que também são considerados como marcadores morfofuncionais da diferenciação/maturação das células de Sertoli (Russel *et al.*, 1989). A partir desse período, é considerado que as células de Sertoli não mais se dividem (Steinberger & Steinberger, 1971; Orth, 1982; França & Russel, 1998; França *et al.*, 2000; Sharpe *et al.*, 2003; França *et al.*, 2005) e passam a constituir uma população terminalmente diferenciada (Kluin *et al.*, 1984; Sharpe *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2009; Mital *et al.*, 2011) e estável no testículo (Buzzard *et al.*, 2003; Sharpe *et al.*, 2003; França *et al.*, 2005; Hayrabyan *et al.*, 2012), particularmente pelo fato de que apoptoses de células de Sertoli adultas serem raramente observadas em condições normais (Russel *et al.*, 2001). Entretanto, diferentemente do que é classicamente estabelecido, diversos trabalhos publicados na última década, incluindo-se os resultados obtidos no presente estudo, indicam que a população de células de Sertoli em mamíferos pode não ser numericamente estável ou terminalmente diferenciada no período pré e pós-púbere (Chaudhary *et al.*, 2005; Tarulli *et al.*, 2006; Trivedi *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2009; Chui *et al.*, 2011; Tarulli *et al.*, 2012; Dufour *et al.*, 2014). Existem ainda evidências em algumas espécies sazonais, como cavalos, de que o número de células de Sertoli varia conforme a estação reprodutiva (Johnson and Thompson, 1983; Johnson *et al.*, 1991). Ademais, após a puberdade e início da maturidade sexual, apesar de ser observada estabilização no diâmetro tubular e na eficiência das células de Sertoli (mensurada como número de células germinativas por célula de Sertoli), em várias espécies de mamíferos já investigadas observa-se aumento significativo do peso testicular, da produção espermática e do comprimento tubular (Podany, 1969; Swierstra, 1973; Johnson & Thompson, 1983; Ekwall *et al.*, 1984; França, 1987;

Berndtson & Thompson, 1990; Castro *et al.*, 1991; Meisami *et al.*, 1992; Russell, 1992; França *et al.*, 2000).

Em grande parte, a premissa de uma população adulta de células de Sertoli terminalmente diferenciada ocorre devido a não observação de divisão dessas células, por exemplo, em testículos de ratos adultos ou de homens normais (Steinberger & Steinberger, 1971; Russell & Clermont, 1977; McLachlan *et al.*, 1995; Zhengwei *et al.*, 1998; McLachlan *et al.*, 2002; Matthiesson *et al.*, 2006; Sridharan *et al.*, 2007). Entretanto, em contraste com o que está correntemente estabelecido na literatura e desafiando o dogma atual, no presente estudo encontramos atividade proliferativa em células de Sertoli (Ki-67/BrdU positivas, p27 negativas) localizadas na região de transição tanto em ratos de 36 dias de idade pós-natal, quanto naqueles sexualmente maduros e com 120 dias de idade pós-natal. Pela quantificação utilizando-se o marcador Ki-67, foi observado que, embora reduzido, aproximadamente 4% e 1% das células de Sertoli proliferavam na região de transição em ratos jovens e adultos respectivamente.

É sabido que o processo de proliferação/maturação das células de Sertoli é controlado, e regulado temporalmente, por diversos fatores tais como os hormônios FSH e tireoidianos (França *et al.*, 2005; Tarulli *et al.*, 2012). Também é amplamente conhecido que o FSH estimula a proliferação das células de Sertoli durante o início do desenvolvimento pós-natal (Plant & Marshall, 2001; Sharpe *et al.*, 2003). No entanto, embora desempenhe importante papel na espermatogênese (Chen & Liu, 2014), sua função ao término do período proliferativo não é ainda bem investigada (Meachem *et al.*, 2005). Em contraste com o FSH, o hormônio tireoidiano desempenha importante papel na diferenciação das células de Sertoli (Van Haaster *et al.*, 1992; Auharek & França, 2010), agindo através das proteínas p21 e p27 – que são inibidoras da proliferação celular (Cooke *et al.*, 2005; Holsberger & Cooke, 2005; Holsberger *et al.*, 2005). Com base nos resultados encontrados no presente estudo, e com a finalidade de se buscar elucidar os mecanismos envolvidos na atividade proliferativa das células de Sertoli, seria interessante investigar a expressão dos receptores de FSH e hormônios tireoidianos nas células de Sertoli presentes na região de transição.

- **AR**

O AR é um fator de transcrição induzível por ligante e que regula a expressão de genes alvos em resposta aos andrógenos (Sheckter *et al.*, 1989; Keller *et al.*, 1996; O'Donnell *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1999; Heinlein & Chang, 2002; O'Donnell *et al.*, 2009; Stanton *et al.*, 2012). Um ponto debatido na literatura é ação dos andrógenos e de seus receptores (AR) na maturação das células de Sertoli (Tan *et al.*, 2005). Sabe-se que no período de maturação dessas células, ocorre um aumento na expressão de AR em todo o testículo, provavelmente devido ao aumento do número de células de Leydig e ao aumento de receptores expressos nas células de Sertoli (Buzek & Sanborn, 1988). Essa elevada expressão de AR é associada ao término do período proliferativo e à diferenciação das células de Sertoli (Hazra *et al.*, 2013). Em contraposição, a ausência de AR claramente impacta negativamente a maturação dessas células (Willems *et al.*, 2010), o que indica que as células de Sertoli que não expressam AR observadas na região de transição, tanto em animais jovens quanto em adultos, possuem um fenótipo mais imaturo. De certa forma, podemos especular que o baixo número de células germinativas (particularmente em estágios mais avançados da espermatogênese) presentes na região de transição (Herms & Dworkin, 1988) influenciaria na existência dessas células de Sertoli que não expressam AR (O'Donnell *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2010), visto que, conforme considerado na literatura, o complemento dessas células germinativas teria importante papel na formação de junções de oclusão (barreira das células de Sertoli) e, por conseguinte, na maturação das células de Sertoli (Willems *et al.*, 2010).

É importante ser ressaltado que na medida em que ocorre o amadurecimento sexual, ambas as ações dos andrógenos e expressão de AR nas células de Sertoli se tornam estágio-específicas (Bremner *et al.*, 1994; Suarez-Quian *et al.*, 1999; Meistrich *et al.*, 2003). Neste estudo, observamos que na região de transição as células de Sertoli apresentam uma expressão relativa de AR similar àqueles estágios de reduzida expressão. A menor expressão de AR pode ser indicativa de um status menos maduro das células de Sertoli localizadas na região de transição (Sharpe *et al.*, 2003), visto que falhas na maturação dessas células já foram associadas com a ausência ou menor expressão desse receptor (Regadera *et al.*, 2001). Assim, a menor expressão de AR observada na região de transição pode estar relacionada à hipótese de que as células

de Sertoli dessa região possam apresentar um fenótipo mais indiferenciado e, assim, hábil de proliferar.

Ainda neste contexto, similar aos achados do presente estudo, Tarulli e colaboradores observaram células de Sertoli expressando Ki-67 coincidente com uma menor expressão de AR após supressão hormonal em homens (Tarulli *et al.*, 2013), indicando que células de Sertoli com capacidade proliferativa apresentam menor expressão de AR, e, conseqüentemente, alteração do status de diferenciação (Steger *et al.*, 1996; Kliesch *et al.*, 1997; Steger *et al.*, 1999). Portanto, uma vez mais pode ser inferido que a menor capacidade das células de Sertoli em responder aos andrógenos estaria associada com um fenótipo mais indiferenciado (Tarulli *et al.*, 2013).

- **GATA-4**

GATA-4 é um fator de transcrição expresso principalmente nas células de Sertoli e em células de Leydig adultas (Viger *et al.*, 1998; Ketola *et al.*, 1999, 2002; McCoard *et al.*, 2001; Oreal *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2004; LaVoie *et al.*, 2003, 2004; Martin *et al.*, 2012) importante para o desenvolvimento e função testicular de mamíferos, particularmente nos aspectos envolvidos na regulação de expressão gênica e na diferenciação celular (Tevosian *et al.*, 2002; Bouma *et al.*, 2007; Manuylov *et al.*, 2007; Kojima *et al.*, 2008; Viger *et al.*, 1998, 2008; Manuylov *et al.*, 2011; Tevosian, 2014). Mais especificamente, no testículo esse fator é fundamental na diferenciação e na regulação da função das células de Sertoli, e também requerido para adequadas interações entre essas células somáticas e as células germinativas (Bielinska *et al.*, 2007; Kyrönlähti *et al.*, 2011; Tevosian, 2014). De modo semelhante quanto ao AR, tanto em ratos jovens quanto naqueles adultos, encontramos células de Sertoli que não estavam expressando GATA-4 na região de transição e na área adjacente a esta região. A ausência de GATA-4 pode estar associada a uma disfunção/função alterada das células de Sertoli, afinal já foi observado que em camundongos knockout condicional para GATA-4, além do desenvolvimento de atrofia testicular, comprometimento da espermatogênese e perda da fertilidade, as células de Sertoli apresentaram vacuolização e também se constatou maior permeabilidade da barreira hematotesticular (Kyrönlähti *et al.*, 2011) – características semelhantes a aquelas encontradas na região de transição.

A ausência de GATA-4 pode estar também relacionada com falhas na diferenciação de células de Sertoli (Bielinska *et al.*, 2007; Manuylov *et al.*, 2011). Dentre os diversos genes testiculares regulados pelo GATA-4 (Viger *et al.*, 1998; Ketola *et al.*, 1999; Tremblay & Viger, 1999; Watanabe *et al.*, 2000; Silverman *et al.*, 2006; Nishida *et al.*, 2008; Bhardwaj *et al.*, 2008; Viger *et al.*, 2008; LaVoie & King, 2009; Tevosian, 2014) merece ser ressaltado o *Dmrt1* (Lei & Heckert, 2004), que é um importante fator na diferenciação das células de Sertoli (Raymond *et al.*, 2000; Tevosian *et al.*, 2002; Anttonen *et al.*, 2003; Lei & Heckert, 2004; Kim *et al.*, 2007a; Manuylov *et al.*, 2011). Neste sentido, em animais knockouts para *Dmrt1*, as células de Sertoli não completam a diferenciação e apresentam proliferação exacerbada (Raymond *et al.*, 2000). Isso evidencia que, por estimular a expressão do *Dmrt1*, o GATA-4 é de fato importante na diferenciação das células de Sertoli (Lei & Heckert, 2004; Manuylov *et al.*, 2011), reforçando, portanto, que as células de Sertoli que não expressam GATA-4 na região de transição, conforme encontrado no presente estudo, apresentam fenótipo indiferenciado.

- **CCR2**

O CCR2 pertence à família de receptores de quimiocinas  $\beta$  (Guazzone *et al.*, 2012), e suas principais quimiocinas ligantes são o CCL2 (MCP-1), o CCL7 (MCP-3) e o CCL12 (MCP-5) (Sozzani *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001; Ford *et al.*, 2014); quimiocinas classicamente envolvidas na ativação e no recrutamento de monócitos e outras células inflamatórias para locais de inflamação, bem como na própria regulação de macrófagos (Proost *et al.*, 1996; Sarafi *et al.*, 1997; Menten *et al.*, 2001; Gerdprasert *et al.*, 2002; Guazzone *et al.*, 2003; Charo & Taubman, 2005). De modo geral, as quimiocinas podem agir como agentes homeostáticos e imunomoduladores (Zlotnik & Yoshie, 2000). Inesperadamente, observamos expressão nuclear (Favre *et al.*, 2008) de CCR2 principalmente nas células de Sertoli localizadas na região de transição, sendo que no indivíduo adulto o número de células de Sertoli expressando esse receptor é consideravelmente maior.

Pelo fato de ser sabido que as células de Sertoli desempenham atividade imunorreguladora (Sanberg *et al.*, 1996; Korbitt *et al.*, 2000; Suarez-Pinzon *et al.*, 2000; Dufour *et al.*, 2003; Chui *et al.*, 2011), pode ser especulado que a maior

expressão de CCR2 observada nas células de Sertoli localizadas na região de transição de ratos adultos estaria relacionada com a indução de tolerância a autoantígenos. Sabe-se que o CCR2 também é um marcador de células dendríticas imaturas, residentes em testículos normais, que induzem tolerância a autoantígenos (Steinman, 1991; Thomas & Lipsky, 1996; Steinman *et al.*, 2003; Rival *et al.*, 2006, 2007). Por outro lado, já foi visto que, em casos de orquite, essas células dendríticas adquirem um fenótipo maduro (pró-inflamatório) coincidente com a diminuição na expressão de CCR2 (Rival *et al.*, 2007). Neste sentido, as células de Sertoli poderiam também assumir um papel importante na indução de tolerância a autoantígenos, uma vez que é relatado que ao redor da região de transição ocorre maior prevalência de linfócitos e macrófagos (Takahashi *et al.*, 2006) que, eventualmente, poderiam exibir autorreação contra os antígenos de células germinativas particularmente pelo fato de ser também especulado que na região de transição a barreira hematotesticular possa ser mais vulnerável (Osman, 1984) permitindo, assim, maior acesso dessas células do sistema imune ao epitélio seminífero. Portanto, a imunorregulação desse ambiente seria imprescindível para a manutenção de um estado fisiológico adequado à função testicular.

De certa forma, a expressão de CCR2 observada nas células de Sertoli poderia também estar relacionada à regulação de processos de proliferação/diferenciação celular (Gu *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1999; Selzman *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2009). A ativação do CCR2 por CCL2 já foi relacionada a um fenótipo mais agressivo de câncer prostático, induzindo proliferação celular (Loberg *et al.*, 2006, 2007; Lu *et al.*, 2007, 2009; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b; He *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2015). Assim, ao gerar animal knockdown para CCR2, Gao e colaboradores (2013) observaram a inibição da proliferação de células cancerígenas prostáticas. Da mesma forma, Fujino e colaboradores (2006) associaram uma menor expressão de CCR2 com efeitos anti-proliferativos em monócitos. No mesmo trabalho, uma maior expressão de CCL2 bloqueou os efeitos anti-proliferativos. Uma menor expressão de CCR2, já foi inclusive relacionada com maior expressão da conexina 43 (Menzies *et al.*, 2012), que é uma importante proteína reguladora da maturação das células de Sertoli (St-Pierre *et al.*, 2003; Gilleron *et al.*, 2006).

A estimulação do CCR2 nas células de Sertoli provavelmente se dá por mecanismos autócrinos, visto que as próprias células de Sertoli expressam CCL2, CCL7 e CCL12 (Aubry *et al.*, 2000; Guazzone *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2010), ou mesmo parácrinos, uma vez que a expressão de CCL2 é relatada também em células de Leydig, peritubulares mioídes e endoteliais, além de macrófagos (Aubry *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2014). Neste aspecto, Aubry e colaboradores (2000) notaram menor expressão de CCL2 em células de Sertoli imaturas - compatível com nossos dados referentes à menor expressão de CCR2 em células de Sertoli de animais imaturos - embora não se tenha determinado se a expressão de CCL2 diferiria entre animais pré-púberes e sexualmente maduros.

Observamos, finalmente, que o CCR2 também é expresso em espermatócitos primários. Por estudos ainda em andamento no nosso laboratório, foi visto que o knockout para esse receptor em camundongos resultou num maior índice apoptótico dessas células germinativas, bem como em menor produção espermática diária (Campos-Júnior *et al.*, dados não publicados), sugerindo que a sinalização CCL2-CCR2 desempenha importante papel na regulação da sobrevivência dos espermatócitos primários e, conseqüentemente, determinando assim a magnitude da produção espermática.

Recentemente (2014), Ford e colaboradores indicaram que o CCR2 apresenta propriedades de reconhecimento receptor-ligantes sujeitas a uma modulação célula-específica, devido a diferenças no processamento pós-traducional ou heterodimerização desse receptor (El-Asmar *et al.*, 2005; Springael *et al.*, 2006; Sohy *et al.*, 2007, 2009). Na literatura, diversos efeitos da ativação do CCR2 são relatados conforme o tipo e contexto funcional celular (Gu *et al.*, 1997; Selzman *et al.*, 2002; Guazzone *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006; Loberg *et al.*, 2006, 2007; Roca *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009). Neste sentido, mais estudos são necessários com a finalidade de melhor compreender o papel desse receptor na função das células de Sertoli, nos espermatócitos primários e, em última análise, na função testicular.

## **6. CONCLUSÕES**

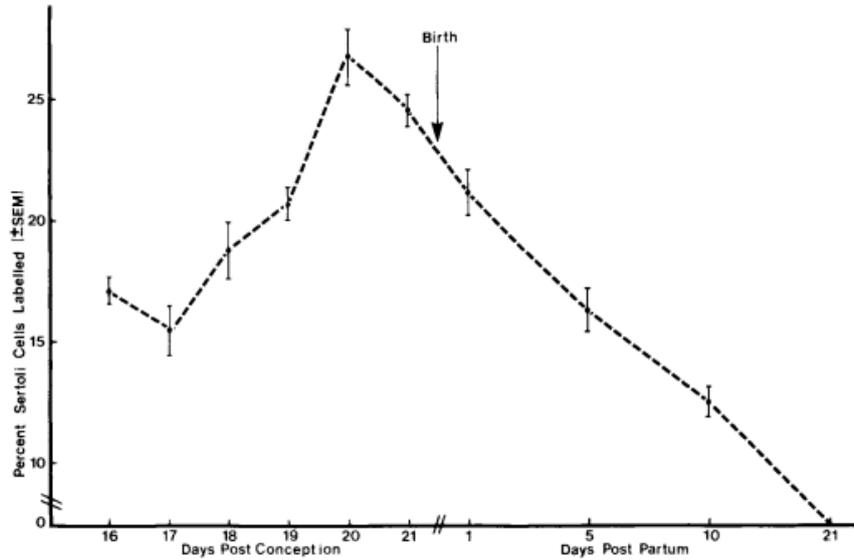
## 6. Conclusões

Como pode ser observado na Fig. 14 e na Tab. 4, os dados obtidos no presente estudo indicam que células de Sertoli de ratos Wistar presentes na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* apresentam um fenótipo distinto quando comparadas às células de Sertoli localizadas ao longo dos túbulos seminíferos. Neste contexto, as imunomarcações revelaram que, aos 36 e 120 dias de idade, existem células de Sertoli na região de transição de ratos Wistar que:

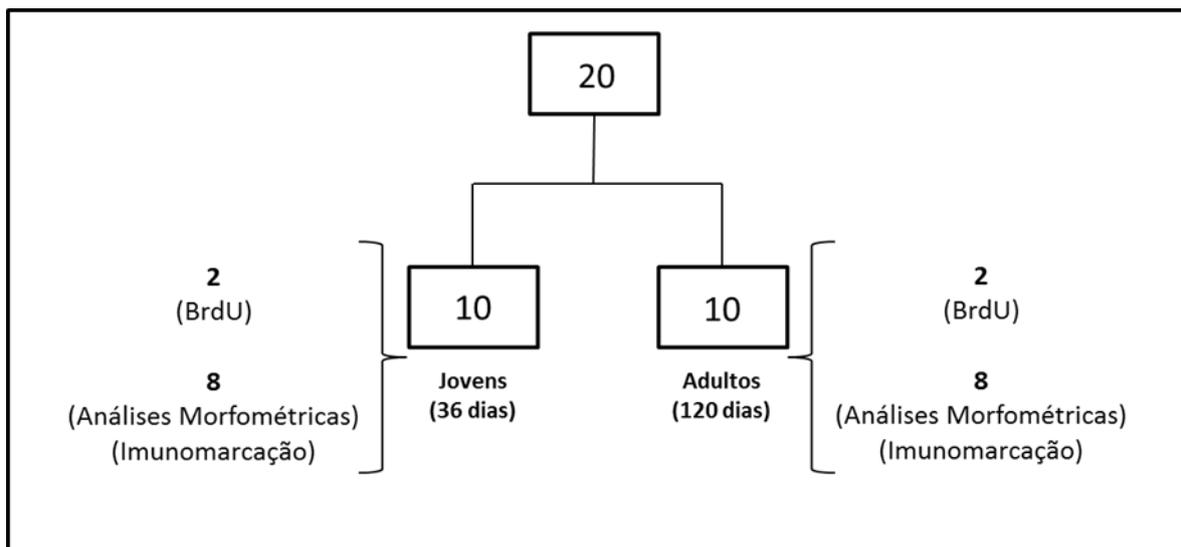
- 1- Expressam Ki-67;
- 2- São marcadas por BrdU;
- 3- Não expressam p27;
- 4- Não expressam AR;
- 5- Não expressam GATA-4;
- 6- Expressam CCR2.

Ainda, na medida em que ocorre o amadurecimento sexual, o número de células de Sertoli proliferativas (Ki-67 e BrdU positivas) se reduz e, concomitantemente, o número de células expressando p27, AR e GATA-4 aumenta. Além disso, a expressão relativa de AR dessas células é menor e semelhante aos estádios dos túbulos seminíferos de menor expressão de AR. Ademais, dadas as observações das duplas marcações por imunofluorescência, existe uma correspondência entre o fenótipo proliferativo com o status de imaturidade dessas células. Finalmente, em relação à expressão de CCR2, o número de células de Sertoli expressando esse receptor aumenta consideravelmente ao ocorrer o amadurecimento sexual, embora o exato papel permaneça ainda desconhecido. Assim, os resultados do presente estudo nos sugerem fortemente a existência de uma subpopulação indiferenciada (progenitora) de células de Sertoli característica da região de transição. Esse status indiferenciado estaria, possivelmente, relacionado com o microambiente específico dessa região particular do parênquima testicular que influenciaria a dinâmica de proliferação/diferenciação celular, aspecto que merece ser investigado mais acuradamente conforme estudos já em andamento no nosso laboratório.

**7. FIGURAS  
E  
TABELAS**

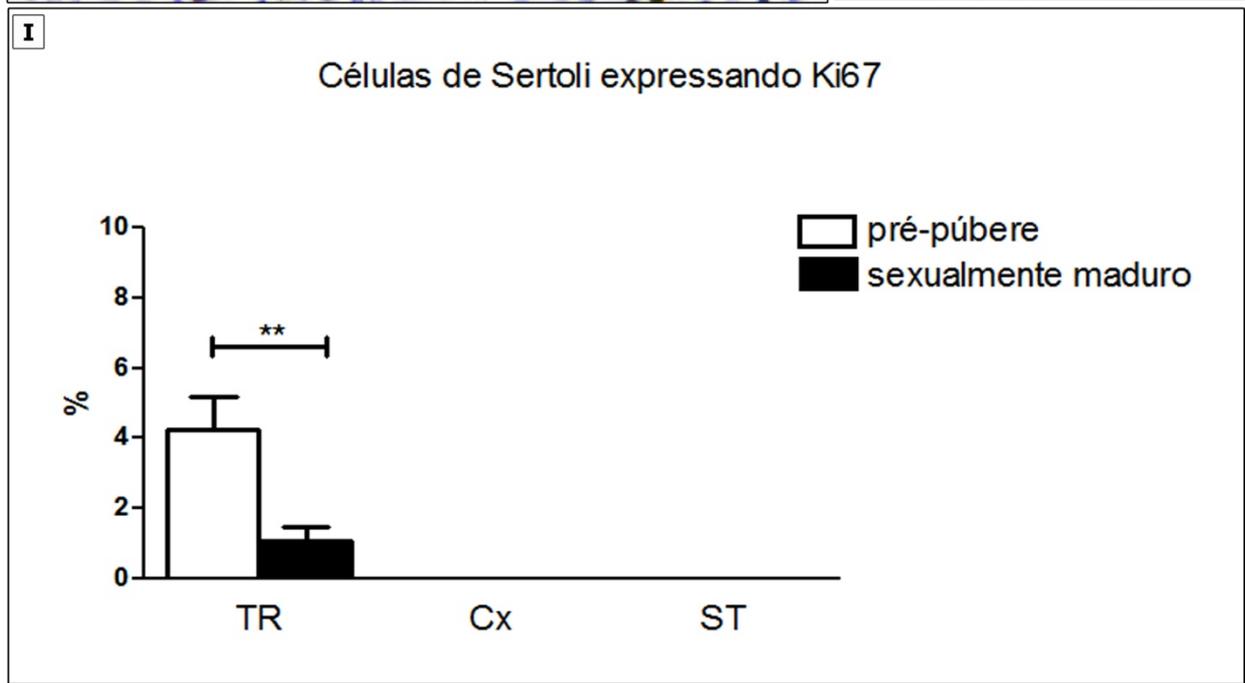
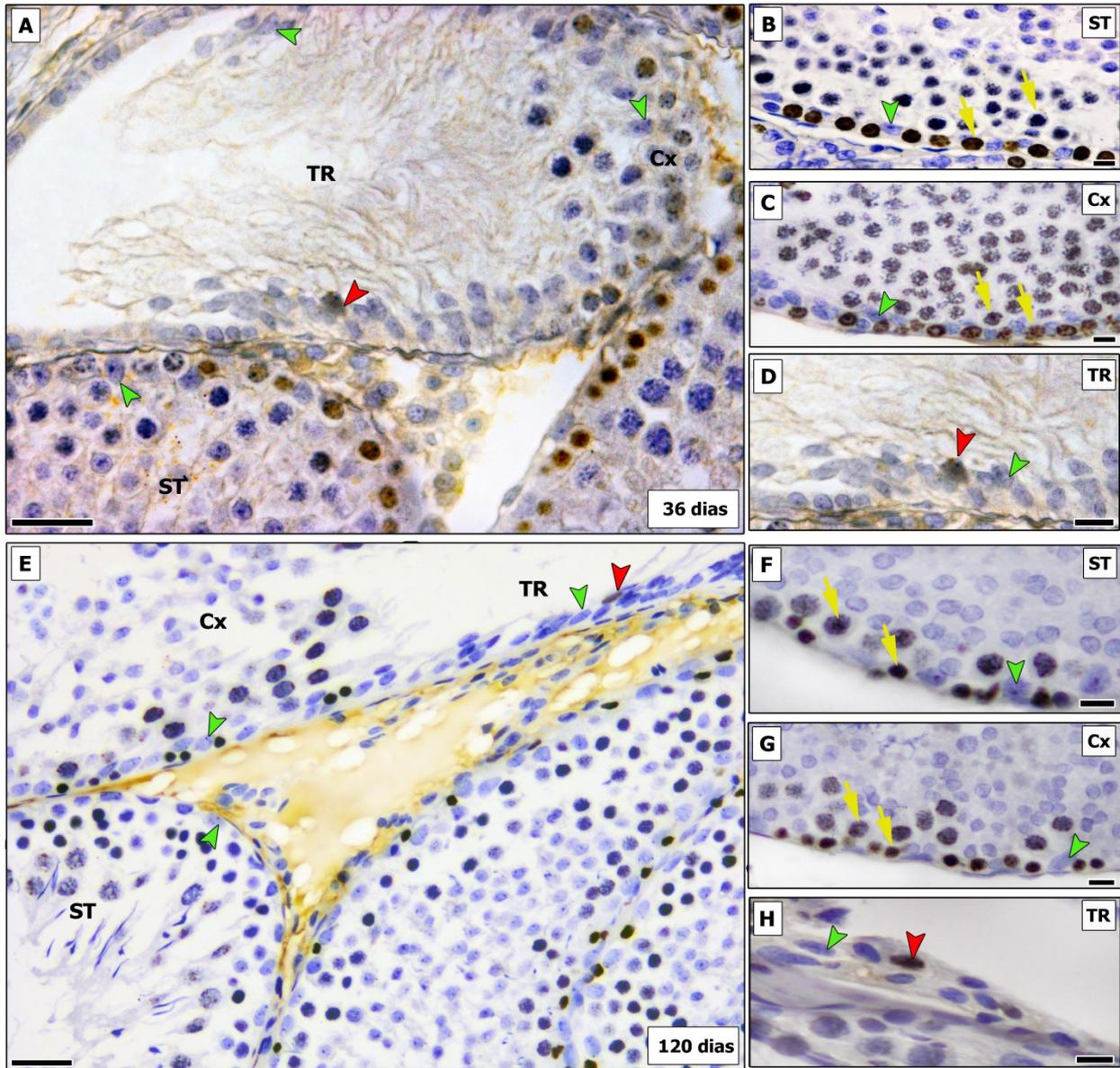


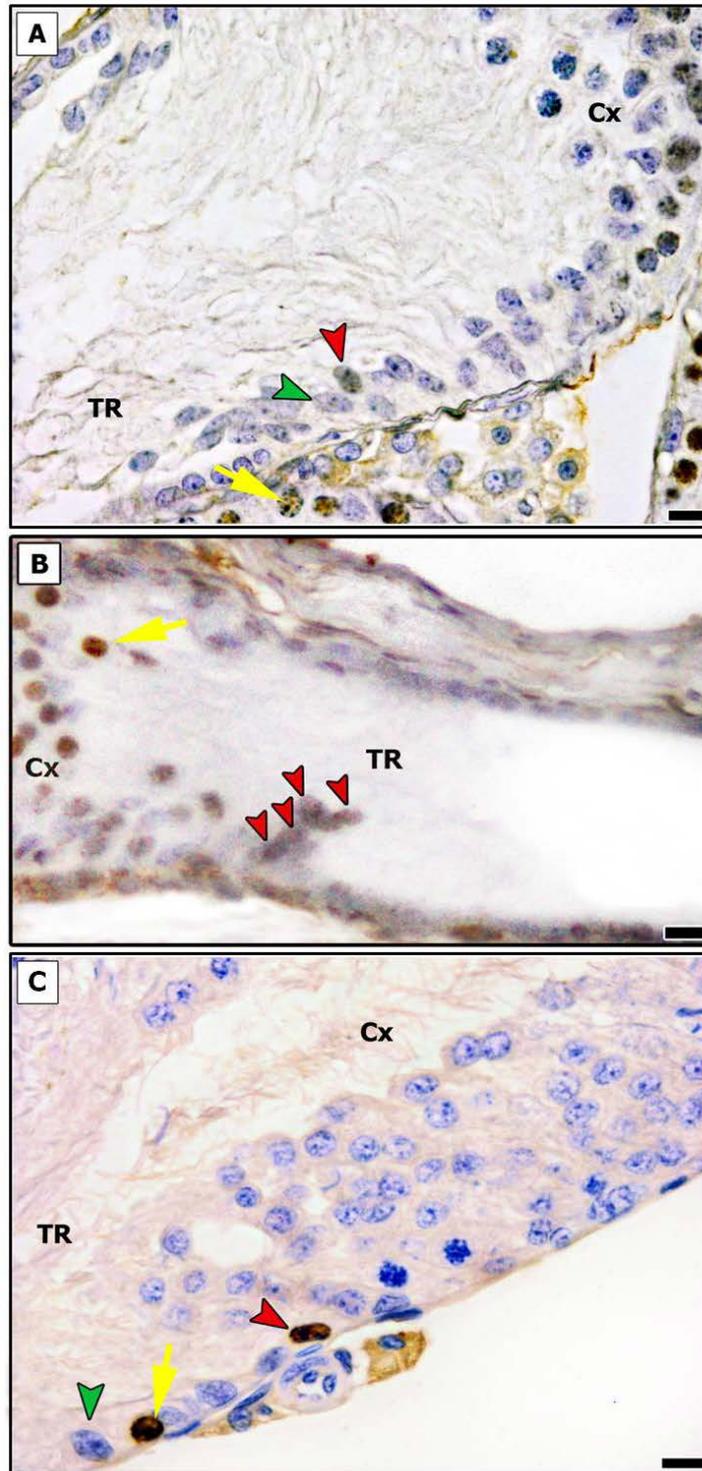
**Figura 1** – Atividade proliferativa das células de Sertoli de ratos avaliada pela marcação de <sup>3</sup>H-timidina (Orth, 1982). Observa-se que neste estudo não foram encontradas células de Sertoli mitóticas após o 21º dia pós-natal.



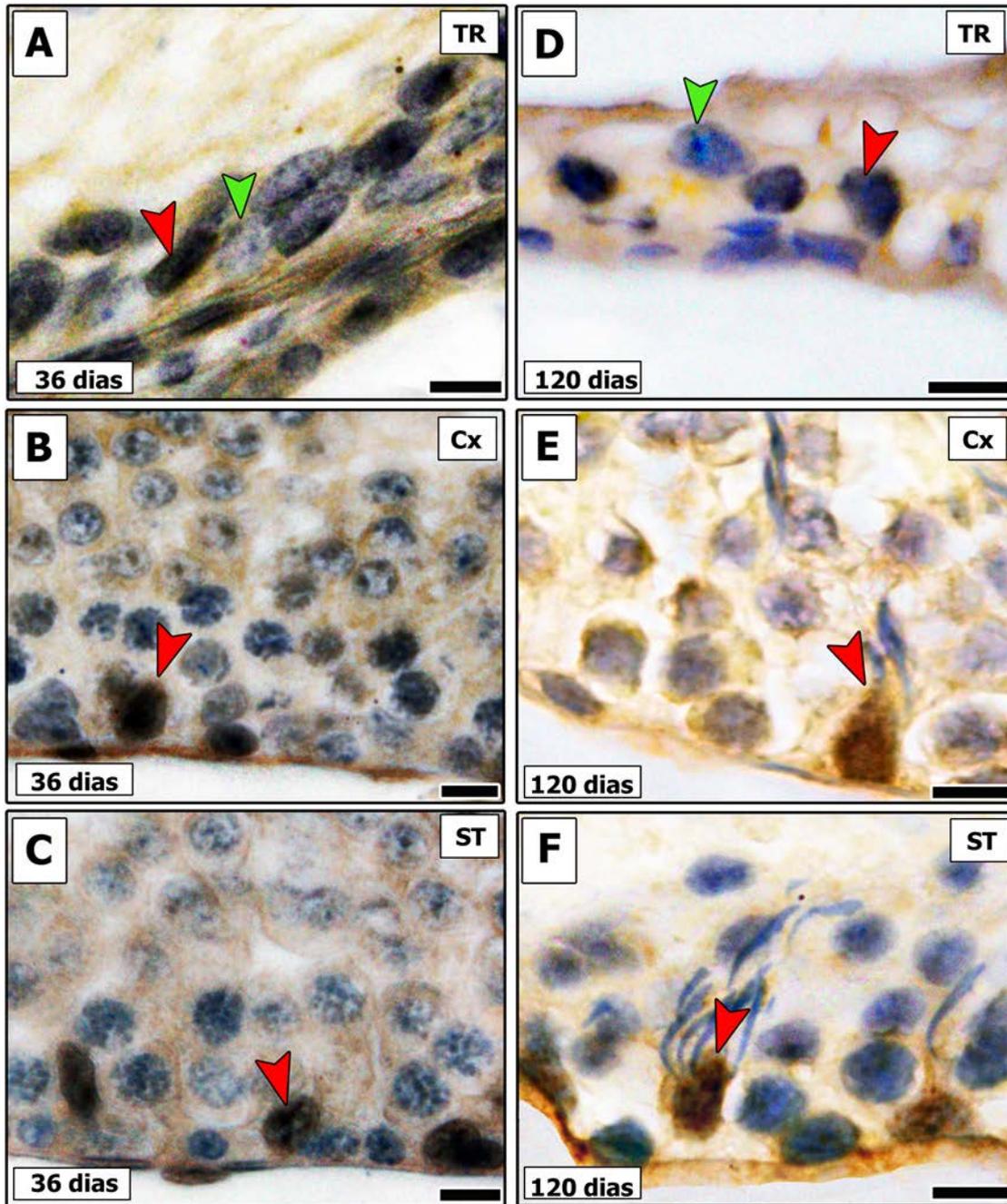
**Figura 2** – Representação esquemática da distribuição do número total (20) de ratos Wistar utilizados nas diferentes abordagens experimentais desenvolvidas no presente estudo. Conforme pode ser notado, dois grupos de animais foram utilizados, ou seja, um grupo composto por 10 ratos pré-púberes (jovens e com 36 dias de idade) e outro composto por 10 animais sexualmente maduros (adultos e com 120 dias de idade). Em cada um desses grupos, 2 ratos receberam injeção intraperitoneal de BrdU para análises de proliferação de células de Sertoli, enquanto os 8 restantes foram utilizados para as análises morfológicas e de imunomarcação.

**Figura 3** – Imunomarcacão para Ki-67 em diferentes áreas testiculares de ratos *Wistar* pré-púberes (A-D) e sexualmente maduros (E-H). Vista mais ampla das áreas investigadas (A, E), compreendendo em detalhe os túbulos seminíferos (ST) (B, F), a área adjacente à região de transição (Cx) (C, G) e a região de transição (TR) (D, H). Células de Sertoli positivas estão indicadas por cabeças de setas vermelhas, enquanto as negativas estão indicadas por cabeças de setas verdes. Na TR, encontram-se células de Sertoli em proliferação (cerca de 4% no indivíduo de 36 dias). Embora o número reduza significativamente, em ratos sexualmente maduros ainda é possível observar nesta fase células de Sertoli proliferando ( $p < 0,05$ ) (I). Observam-se também células germinativas em proliferação (setas amarelas). Barra: 50 $\mu$ m (A, E); 10 $\mu$ m (B-D, F-H).



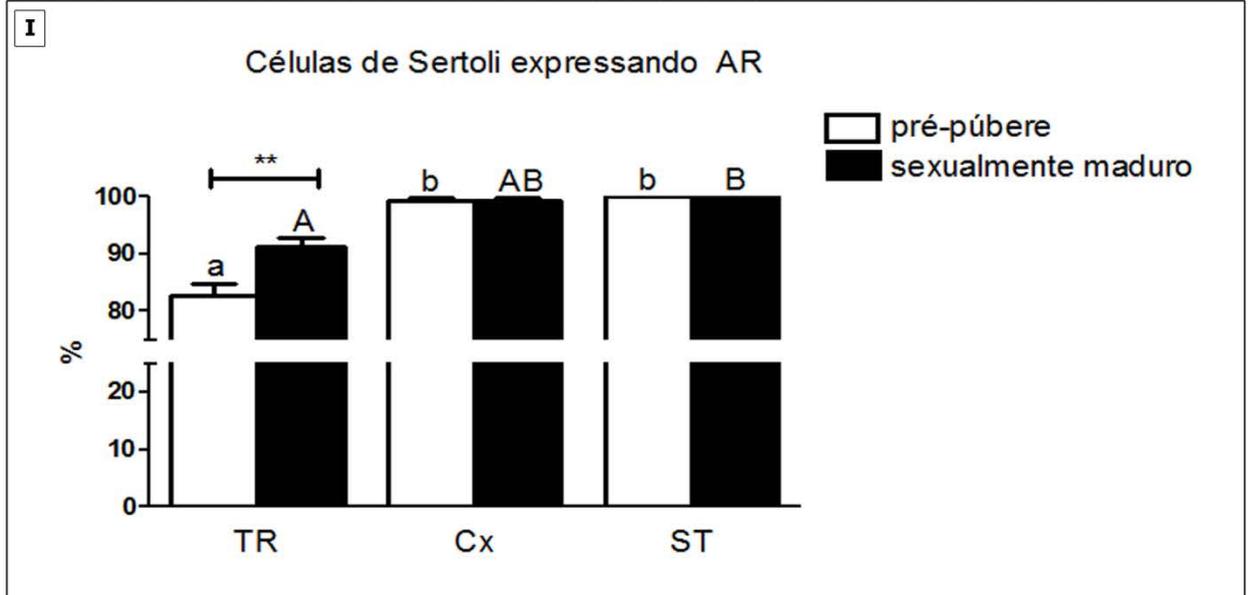
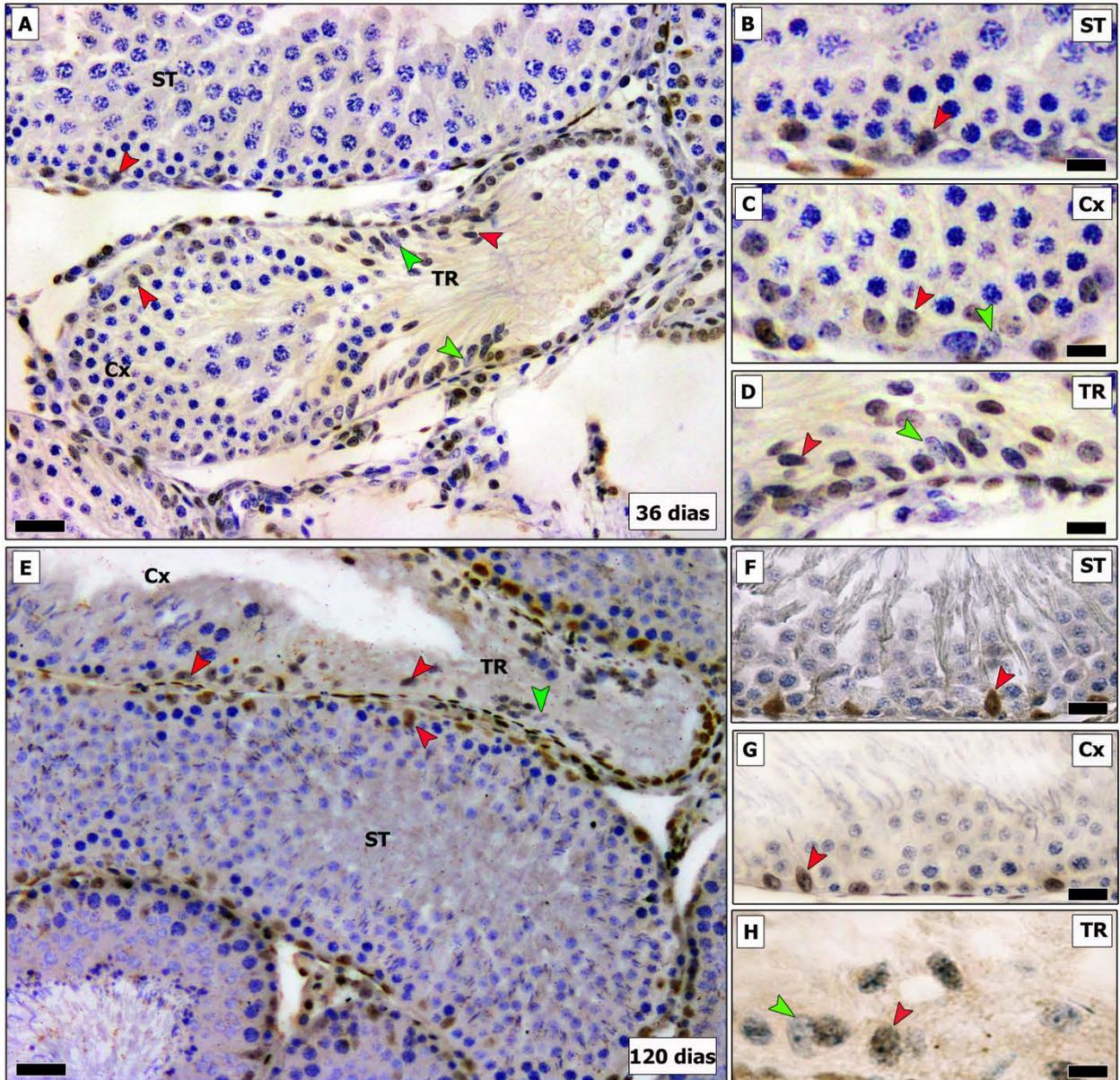


**Figura 4** – Imunomarcacão para BrdU contemplando a região de transio (TR) e a área adjacente  TR (Cx) de testículos de ratos *Wistar* pr-beres (A-B) e sexualmente maduros (C). Como já foi visto, células de Sertoli são encontradas proliferando na TR (cabeças de setas vermelhas). Interessante mencionar que em um dos ratos pré-beres analisados, foi encontrado um grupo de células de Sertoli marcadas para BrdU (B). Células de Sertoli negativas estão indicadas por cabeças de setas verdes. Células germinativas em proliferao estão indicadas por setas amarelas. Barra: 10µm.

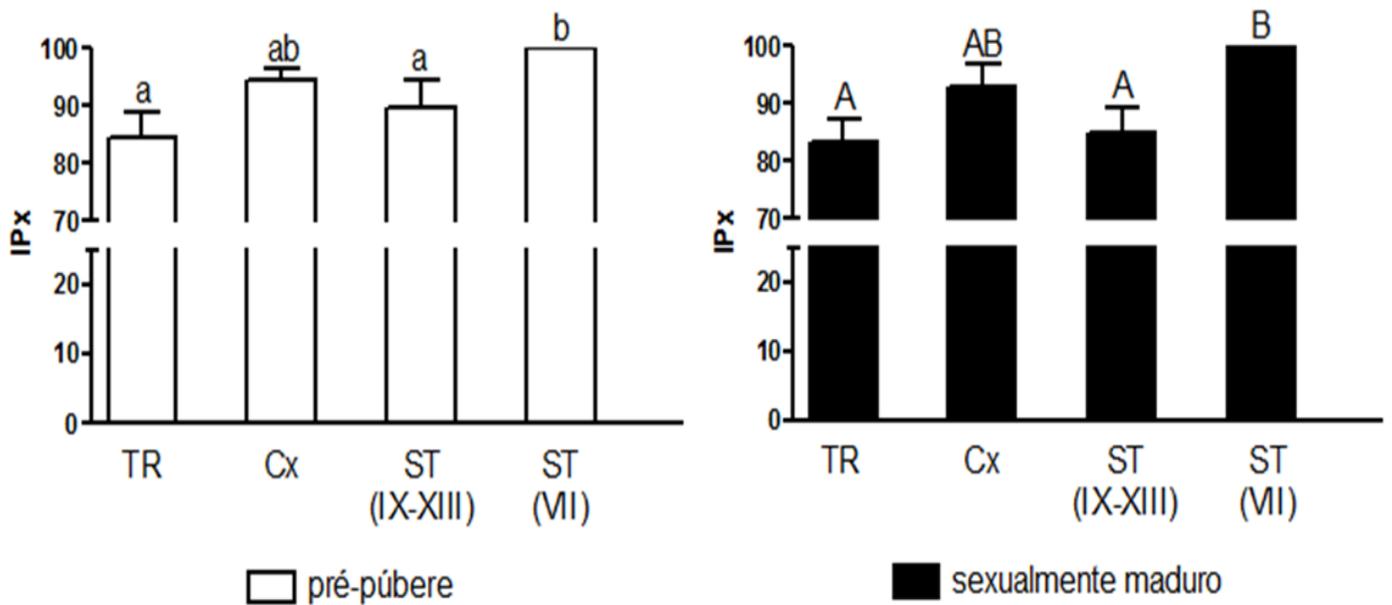


**Figura 5** – Imunomarcção para p27 em diferentes áreas testiculares de ratos *Wistar* pré-púberes (A-C) e sexualmente maduros (D-F), contemplando a região de transição (TR) (A, D), a área adjacente à região de transição (B, E) e ao longo dos túbulos seminíferos (C, F). Células de Sertoli negativas (cabeças de setas verdes) são encontradas na TR tanto em indivíduos jovens (A) quanto em adultos (D). Já nas outras regiões, observamos caracteristicamente células de Sertoli marcadas (cabeças de setas vermelhas, A-F). Barras: 10 $\mu$ m.

**Figura 6** – Imunomarcção para AR em diferentes áreas testiculares de ratos *Wistar* pré-púberes (A-D) e sexualmente maduros (E-H). Vista mais ampla das áreas investigadas (A, E), compreendendo em detalhe os túbulos seminíferos (ST) (B, F), a área adjacente à região de transição (Cx) (C, G) e a região de transição (TR) (D, H). Células de Sertoli positivas estão indicadas por cabeças de setas vermelhas, enquanto as negativas estão indicadas por cabeças de setas verdes. Observa-se que, na TR, aproximadamente 17% das células de Sertoli não expressam AR no indivíduo pré-púbere, e esse número é reduzido à metade no indivíduo adulto – cerca de 8% ( $p < 0,05$ ) (I). Na Cx (B, G) algumas poucas células de Sertoli foram encontradas também negativas em ambos os grupos (inferior a 1%). Barra: 50 $\mu$ m (A, E); 10 $\mu$ m (B-D, F-H). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes regiões (TR, Cx ou TS) do grupo de 36 dias de idade ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes regiões (TR, Cx ou TS) do grupo de 120 dias de idade ( $p < 0,05$ ).

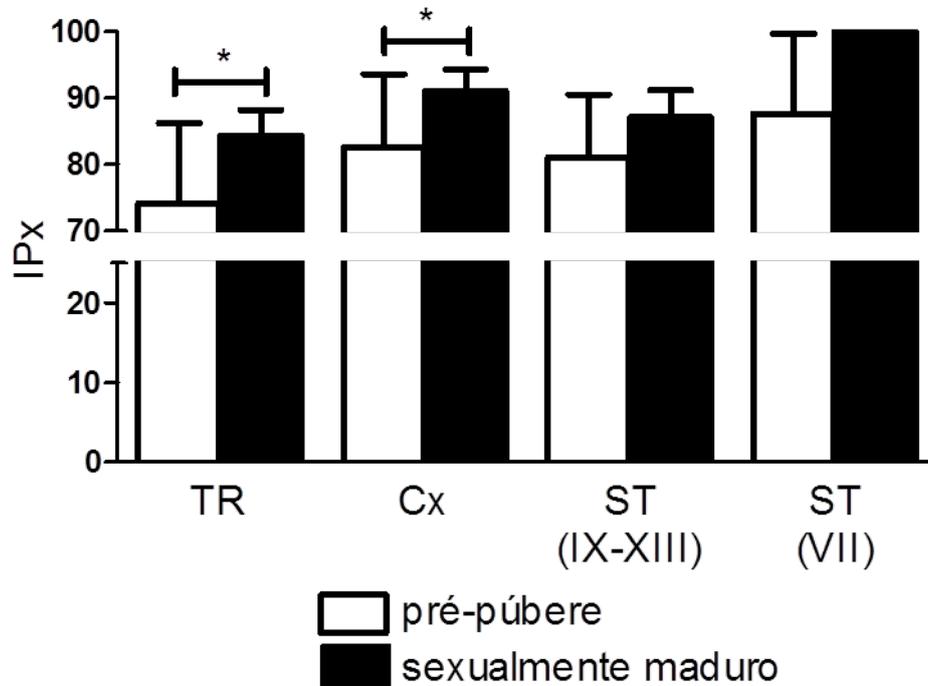


### Expressão Relativa de AR nas células de Sertoli



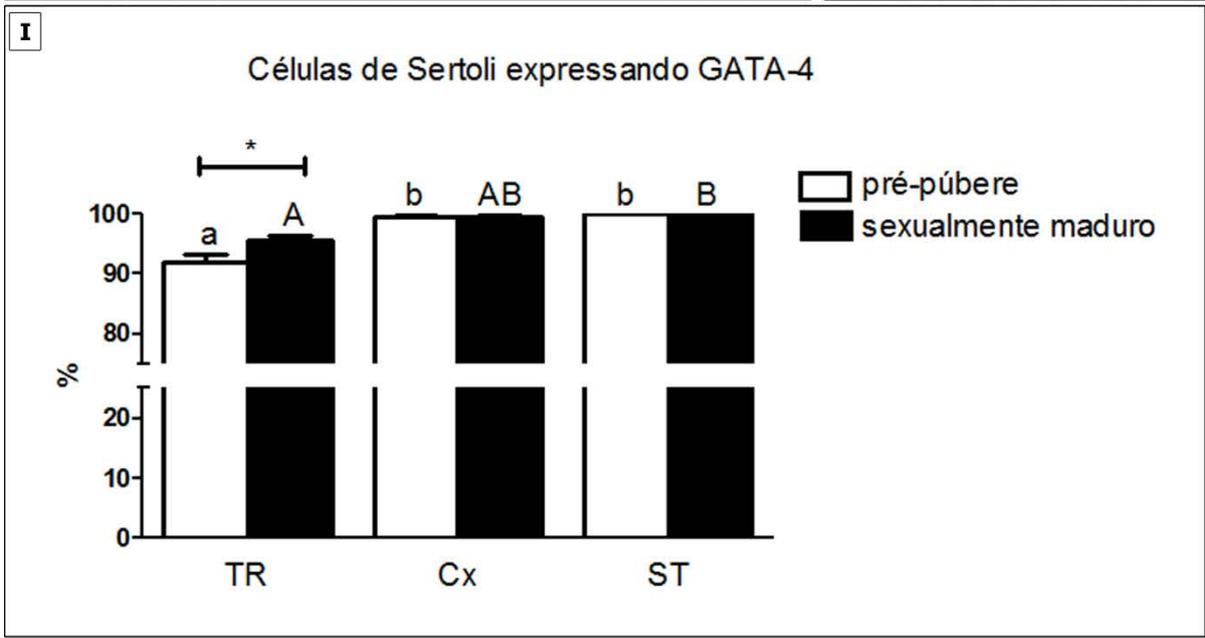
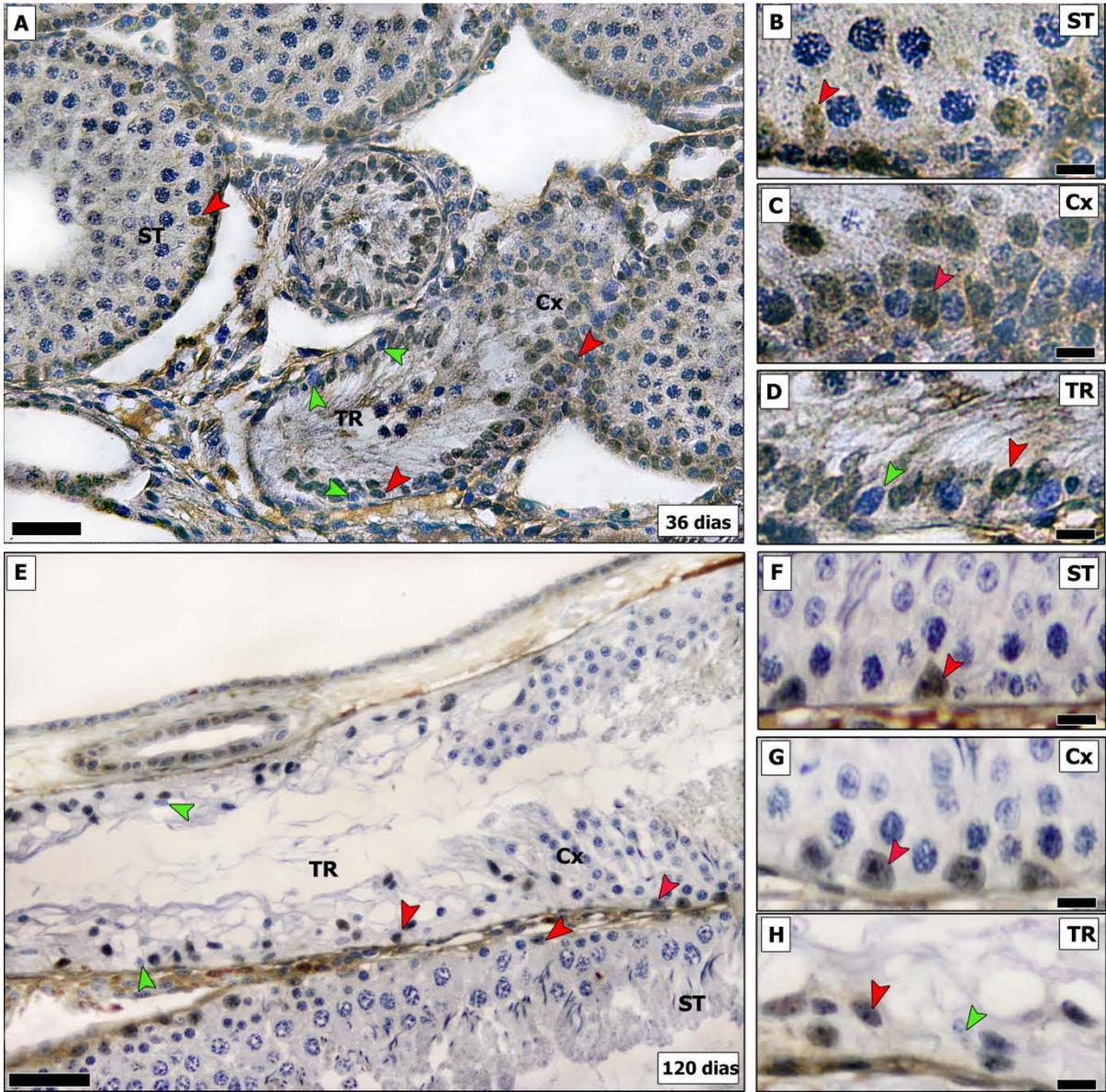
**Figura 7** – Expressão de AR nas células de Sertoli localizadas na região de transição (TR), na área adjacente à TR (Cx), e em túbulos seminíferos (ST) nos estádios IX a XIII relativa à expressão de AR em células de Sertoli presentes em túbulos seminíferos no estágio VII. Observa-se que, tanto em ratos jovens quanto em adultos, a expressão de AR nas células de Sertoli da TR é significativamente semelhante àquela dos estádios IX-XIII e significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que aquela encontrada no estágio VII.

## Expressão de AR nas Células de Sertoli

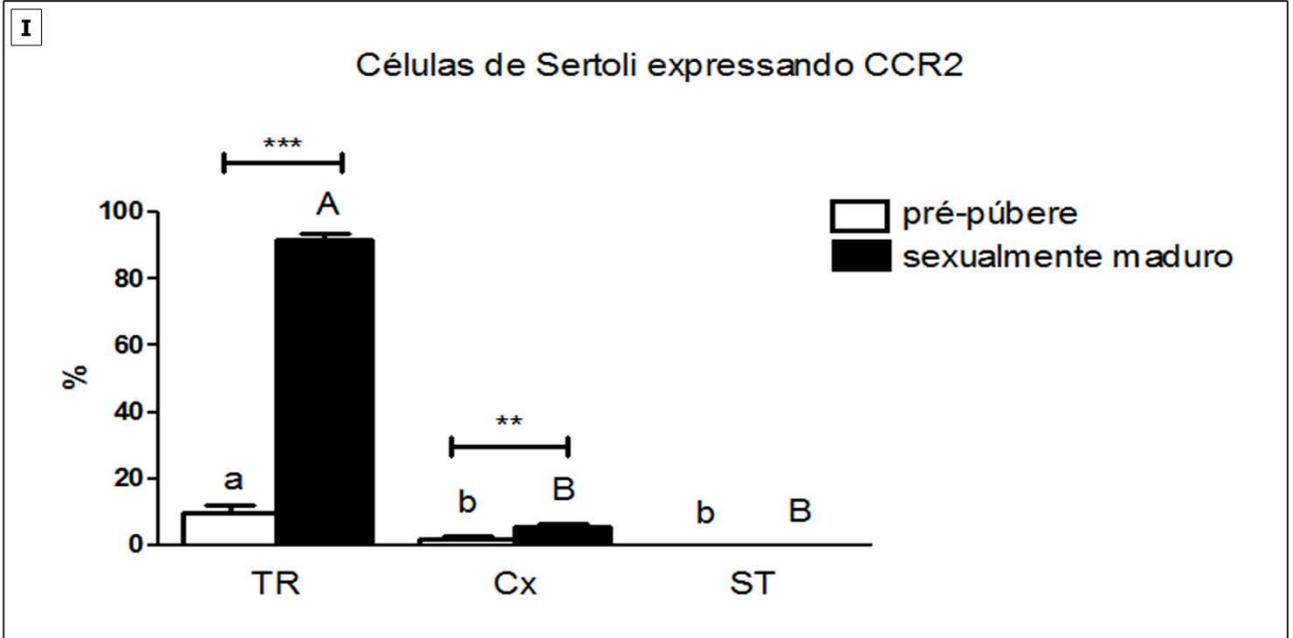
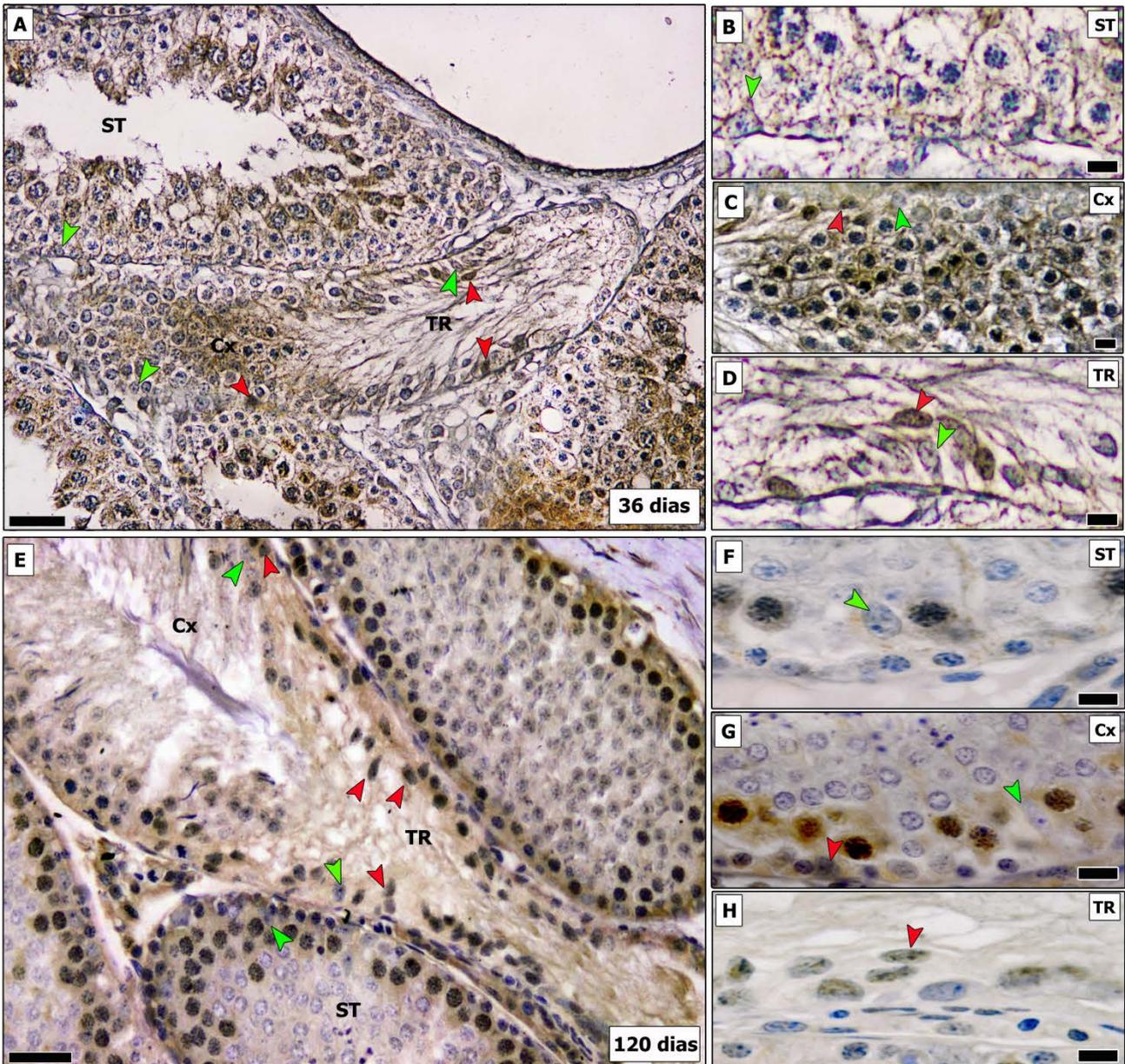


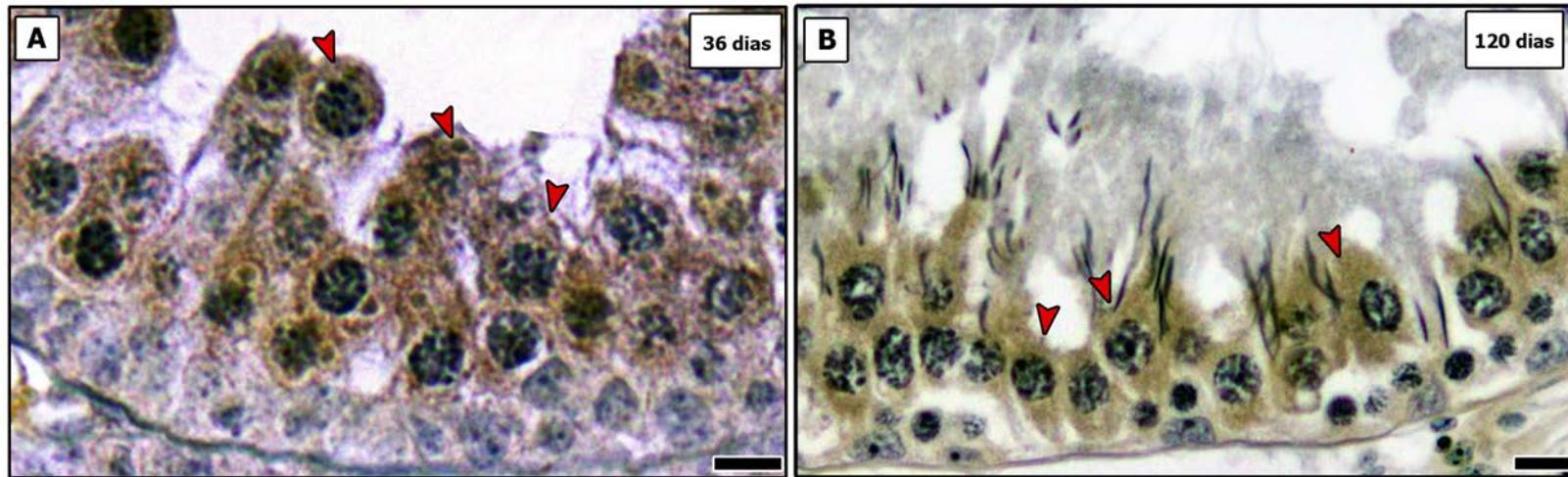
**Figura 8** – Comparação temporal da expressão de AR em células de Sertoli localizadas nas diferentes regiões investigadas de ratos pré-púberes e sexualmente maduros. Observa-se que após ocorrer o amadurecimento sexual, a expressão de AR em células de Sertoli presentes na região de transição (TR) e na área adjacente à TR (Cx) aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ), o que não é observado nas células de Sertoli localizadas ao longo dos túbulos seminíferos tanto nos estádios que naturalmente apresentam menor expressão (ST:IX-XIII) quanto nos de maior expressão de AR (ST:VII).

**Figura 9** – Imunomarcção para GATA-4 em diferentes áreas testiculares de ratos *Wistar* pré-púberes (A-D) e sexualmente maduros (E-H). Vista mais ampla das áreas investigadas (A, E), compreendendo em detalhe os túbulos seminíferos (ST) (B, F), a área adjacente à região de transição (Cx) (C, G) e a região de transição (TR) (D, H). Células de Sertoli positivas estão indicadas por cabeças de setas vermelhas, enquanto as negativas estão indicadas por cabeças de setas verdes. Observa-se que, na TR, cerca de 8% das células de Sertoli não expressam GATA-4 em ratos pré-púberes, e esse número é reduzido à metade em ratos adultos ( $p < 0,05$ ) (I). Na Cx ainda foram encontradas algumas poucas células de Sertoli negativas em ambos os grupos (inferior a 1%). Barra: 50 $\mu$ m (A, E); 10 $\mu$ m (B-D, F-H). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes regiões (TR, Cx ou TS) do grupo de 36 dias de idade ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes regiões (TR, Cx ou TS) do grupo de 120 dias de idade ( $p < 0,05$ ).

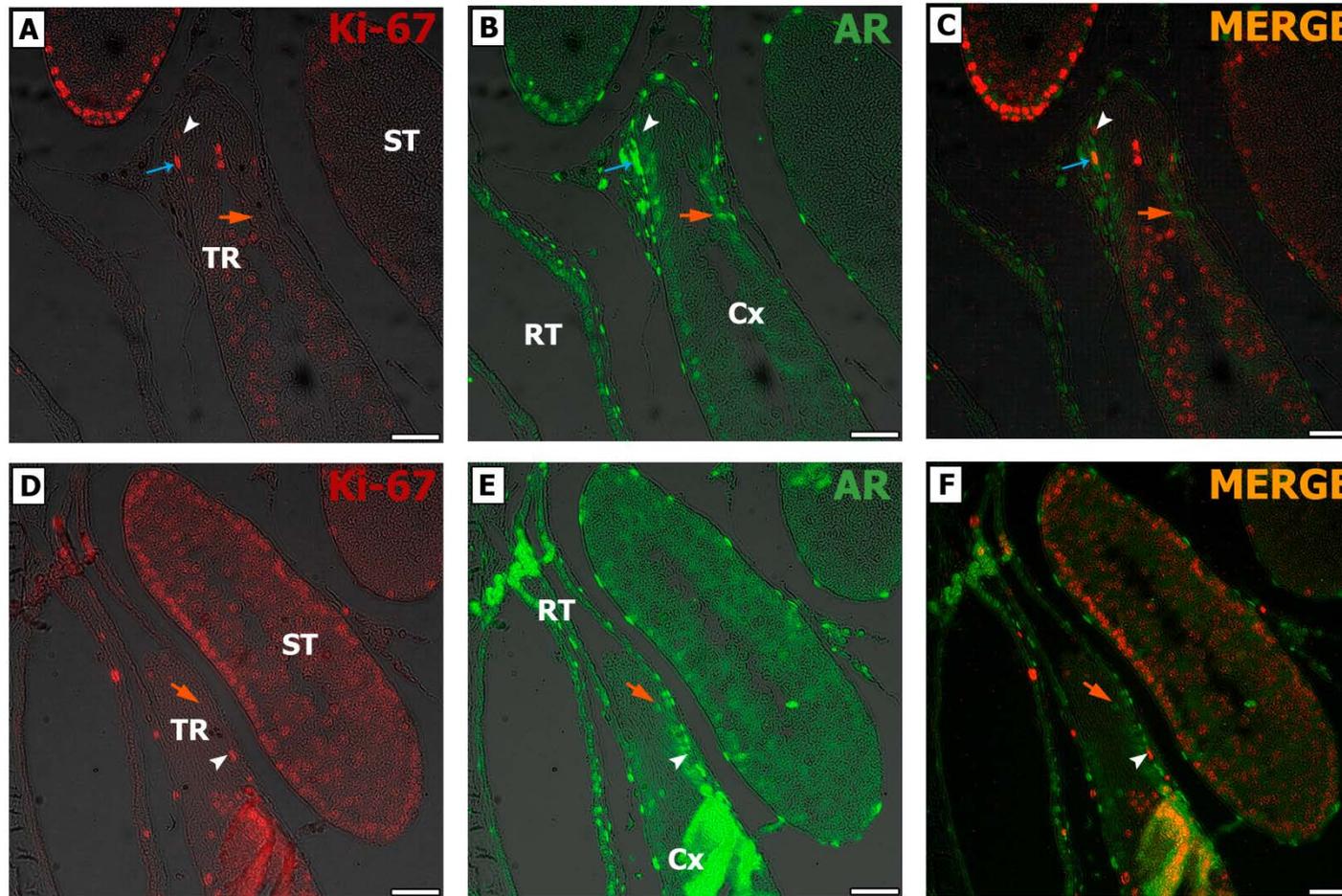


**Figura 10** – Imunomarcção para CCR2 em diferentes áreas testiculares de ratos *Wistar* pré-púberes (A-D) e sexualmente maduros (E-H). Vista mais ampla das áreas investigadas (A, E), compreendendo em detalhe os túbulos seminíferos (ST) (B, F), a área adjacente à região de transição (Cx) (C, G) e a região de transição (TR) (D, H). Células de Sertoli positivas estão indicadas por cabeças de setas vermelhas, e as negativas por cabeças de setas verdes. Observa-se que cerca de 10% das células de Sertoli na TR expressam CCR2 em animais pré-púberes. Esse número aumenta drasticamente compreendendo quase a totalidade (mais de 90%) das células de Sertoli na TR em ratos adultos ( $p < 0,05$ ) (I). Nota-se ainda um aumento significativo de células de Sertoli expressando CCR2 na Cx à medida que ocorre o amadurecimento sexual ( $p < 0,05$ ). Barra: 50 $\mu$ m (A, E); 10 $\mu$ m (B-D, F-H). Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes regiões (TR, Cx ou TS) do grupo de 36 dias de idade ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes regiões (TR, Cx ou TS) do grupo de 120 dias de idade ( $p < 0,05$ ).

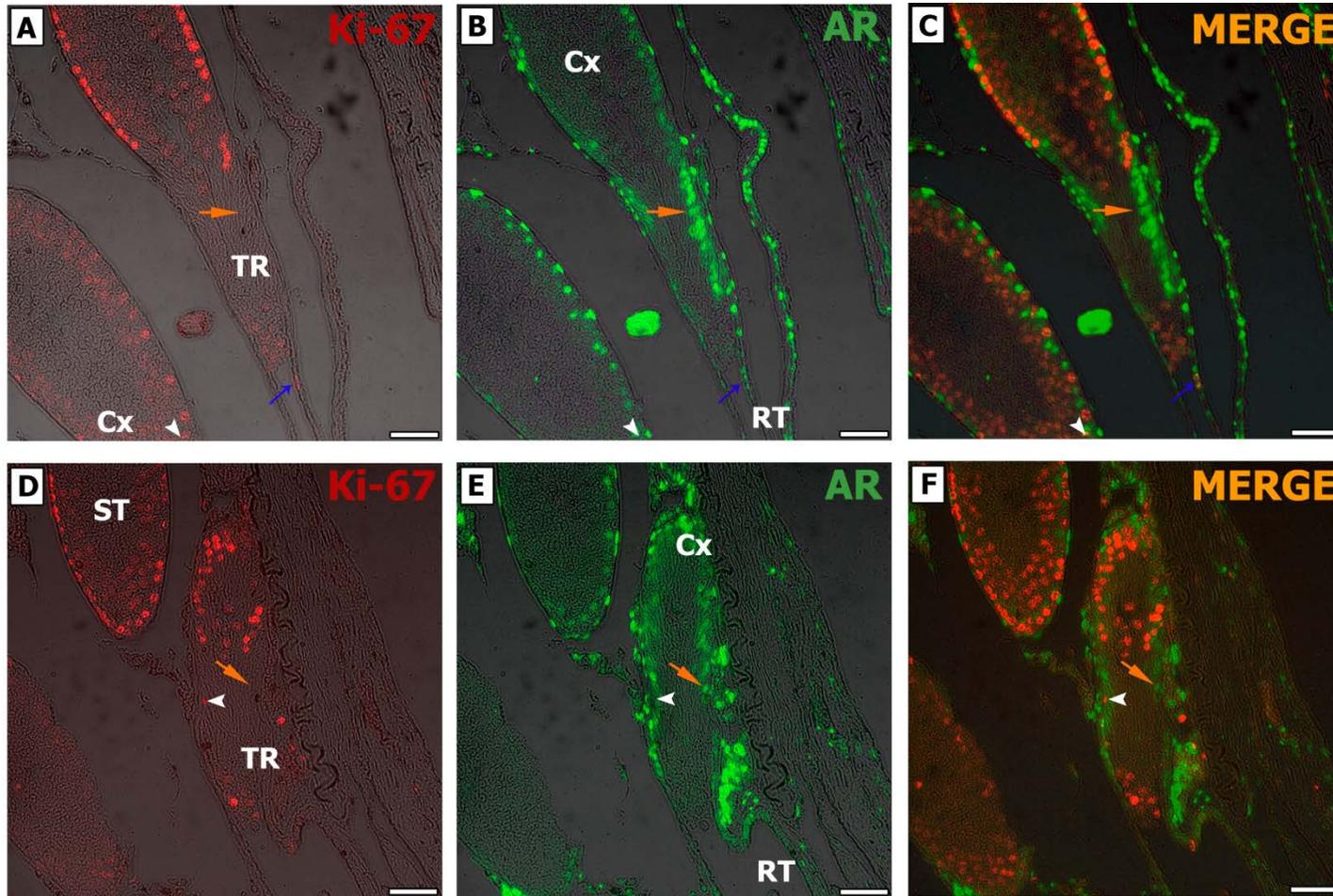




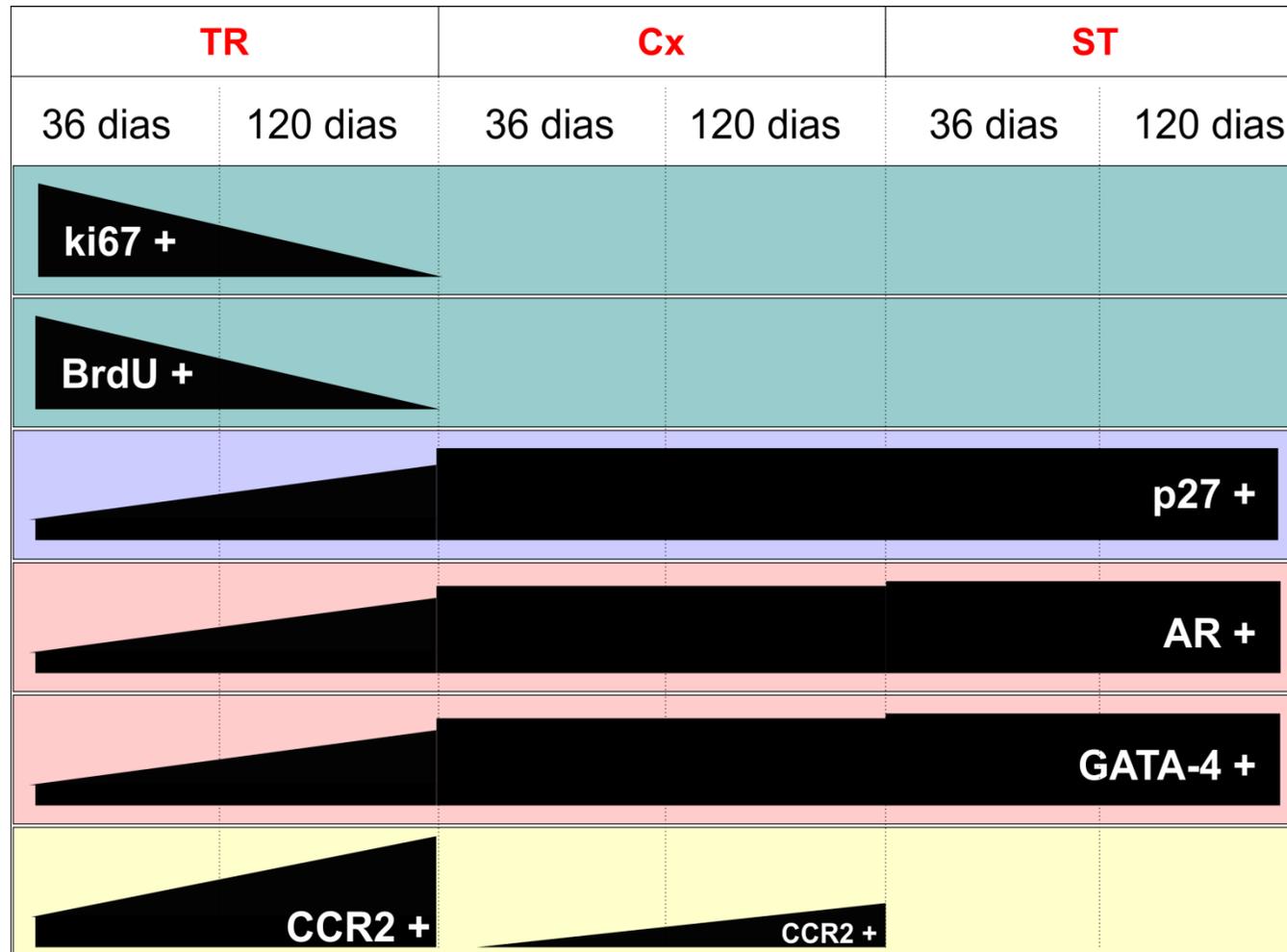
**Figura 11** – Imunomarcção para CCR2, evidenciando o citoplasma e membrana dos espermatócitos primários (cabeças de setas vermelhas) expressando esse receptor ao longo dos túbulos seminíferos e região adjacente à região de transição - tanto em ratos pré-púberes (A) quanto naqueles sexualmente maduros (B). Barra: 10µm.



**Figura 12** – Dupla marcação, em ratos pré-púberes, para Ki-67 (A, D) e AR (B, E) nas diferentes regiões testiculares investigadas. Conforme pode ser observado, normalmente células de Sertoli negativas para Ki-67 são positivas para AR (seta alaranjada; C, F). Assim, foram notadas células de Sertoli Ki-67 positivas e AR negativas na TR (cabeça de seta branca; C, F). Foram observadas ainda células peritubulares mioides na TR proliferando - Ki-67 e AR positivas (seta azul; C). TR: região de transição; Cx: área adjacente à TR; ST: túbulos seminíferos. Barra: 50µm.



**Figura 13** – Dupla marcação, em ratos sexualmente maduros, para Ki-67 (A, D) e AR (B, E) nas diferentes regiões testiculares investigadas. Conforme pode ser observado, normalmente células de Sertoli negativas para Ki-67 são positivas para AR (seta alaranjada; C, F). Também foram notadas células de Sertoli Ki-67 positivas e AR negativas na TR (cabeça de seta branca; C, F). Foram observadas ainda células epiteliais da *rete testis* proliferando - Ki-67 e AR positivas (RT, seta azul; C). TR: região de transição; Cx: área adjacente à TR; ST: túbulos seminíferos. Barra: 50μm.



**Figura 14** – Diagrama esquemático resumindo os resultados obtidos neste trabalho, com a representação relativa das células de Sertoli positivas para os marcadores de proliferação, diferenciação e de interação com células do sistema imune, nas diferentes áreas do parênquima testicular avaliadas em ratos Wistar de 36 e 120 dias de idade. Observe que na TR a expressão desses marcadores é claramente distinta quando comparada àquela da Cx e a dos ST. TR: região de transição; Cx: área adjacente à TR; ST: túbulos seminíferos.

**Tabela 1**– Dados biométricos e morfometria testicular de ratos Wistar pré-púberes e sexualmente maduros (média ± erro padrão da média).

<b>Parâmetros</b>	<b>Ratos Pré-Púberes (36 dias de idade)</b>	<b>Ratos Sexualmente Maduros (120 dias de idade)</b>
<b>Peso Corporal (g)</b>	113 ± 7 <sup>a</sup>	348 ± 25 <sup>b</sup>
<b>Peso Testicular* (g)</b>	0,52 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,92 ± 0,27 <sup>b</sup>
<b>Índice Gonadossomático (%)</b>	0,91 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,14 <sup>b</sup>
<b>Diâmetro Tubular (µm)</b>	238 ± 18 <sup>a</sup>	298 ± 19 <sup>b</sup>
<b>Altura do Epitélio Seminífero (µm)</b>	85 ± 7 <sup>a</sup>	100 ± 7 <sup>b</sup>

\*valor correspondendo à média dos pesos do testículo direito e esquerdo.

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05).

**Tabela 2**– Lista dos fixadores utilizados, temperaturas mantidas durante a fixação e o tempo gasto até o momento da inclusão, de acordo com os objetivos propostos.

<b>Fixador</b>	<b>Temperatura/Tempo Pré-Inclusão</b>	<b>Propósito</b>
Solução de Bouin	Temperatura ambiente/24h	Microscopia Óptica Imunohistoquímica
Paraformaldeído a 4%	4°C/24h	Imunohistoquímica
Metacarn	4°C/24h	Imunohistoquímica Imunofluorescência

**Tabela 3**– Relação dos anticorpos, homologia com proteínas de rato, respectivas diluições, soros e fixadores utilizados no material biológico para a realização dos testes imunohistoquímicos.

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Homologia com a Proteína de Rato</b>	<b>Diluição do Ac Primário</b>	<b>Soro</b>	<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Diluição do Ac Secundário</b>	<b>Fixador</b>
<b>Ki-67</b> Monoclonal Anti-human-Ki67 <i>Pharmingen (#558615)</i>	78,5%	1:50	NHS	Anti-mouse IgG Biotinilado <i>Vector Laboratories</i>	1:200	Paraformaldeído Metacarn
<b>BrdU</b> Monoclonal Anti-mouse-BrdU <i>Pharmingen (#347580)</i>	-	1:100	NHS	Anti-mouse IgG Biotinilado <i>Vector Laboratories</i>	1:200	Paraformaldeído Metacarn
<b>P27 (Kinase inhibitory protein 1)</b> Monoclonal Anti-mouse-p27 <i>Pharmingen (#554069)</i>	96,5%	1:50	NHS	Anti-mouse IgG Biotinilado <i>Vector Laboratories</i>	1:200	Paraformaldeído Metacarn
<b>AR (Androgen receptor)</b> Policlonal Anti-human-AR <i>Santa Cruz (sc-816)</i>	85%	1:50	NGS	Goat pAb to Rb IgG Biotinilado <i>Abcam (ab6720)</i>	1:200	Solução de Bouin Metacarn
<b>GATA-4 (GATA binding protein 4)</b> Policlonal Anti-human-GATA-4 <i>Santa Cruz (sc-25310)</i>	100%	1:100	NHS	Anti-mouse IgG Biotinilado <i>Vector Laboratories</i>	1:200	Solução de Bouin
<b>CCR2 (Chemokine C-C motif receptor 2)</b> Policlonal Anti-human-CCR2 <i>Abcam (ab21667)</i>	76%	1:50	NGS	Goat pAb to Rb IgG Biotinilado <i>Abcam (ab6720)</i>	1:200	Solução de Bouin

NGS = soro normal de cabra (G9023, Sigma-Aldrich®); NHS = soro normal de cavalo (H0146, Sigma-Aldrich®).

**Tabela 4**– Percentual de células de Sertoli positivas para os marcadores de proliferação, diferenciação e de interação com células do sistema imune nas diferentes áreas do parênquima testicular avaliadas em ratos Wistar de 36 e 120 dias (média ± erro padrão da média).

Marcador	TR		Cx		TS	
	36 dias	120 dias	36 dias	120 dias	36 dias	120 dias
<b>Ki-67</b>	4,3 ± 0,9%	1,1 ± 0,4%*	-	-	-	-
<b>AR</b>	82,7 ± 2,1% <sup>a</sup>	91,3 ± 1,3% <sup>A*</sup>	99,3 ± 0,4% <sup>b</sup>	99,3 ± 0,4% <sup>AB</sup>	100% <sup>b</sup>	100% <sup>B</sup>
<b>GATA-4</b>	91,9 ± 1,3% <sup>a</sup>	95,6 ± 0,8% <sup>A*</sup>	99,4 ± 0,4% <sup>b</sup>	99,5 ± 0,3% <sup>AB</sup>	100% <sup>b</sup>	100% <sup>B</sup>
<b>CCR2</b>	9,7 ± 2,4% <sup>a</sup>	92 ± 1,5% <sup>A*</sup>	1,9 ± 0,6% <sup>b</sup>	5,5 ± 0,9% <sup>B*</sup>	-	-

TR: região de transição; Cx: área adjacente à TR; TS: túbulos seminíferos.

\* representa diferenças estatisticamente significativas de uma mesma região (TR, Cx ou TS) entre os grupos 36 dias e 120 dias de idade ( $p < 0,05$ ).

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes regiões (TR, Cx ou TS) do grupo de 36 dias de idade ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes regiões (TR, Cx ou TS) do grupo de 120 dias de idade ( $p < 0,05$ ).

## **8. REFERÊNCIAS**

## 8. Referências

AHMED EA, RIJBROEK AV, KAL HB, SADRI-ARDEKANI H, MIZRAK SC, PELT A, DE ROOIJ DG. Proliferative activity *in vitro* and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biol Reprod* 80:1084-1091. 2009.

AMANN, RP. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl* 2:37-58. 1981.

ANTTONEN M, KETOLA I, PARVIAINEN H, PUSA AH, HEIKINHEIMO M. FOG-2 and GATA-4 are coexpressed in the mouse ovary and can modulate mullerian-inhibiting substance expression. *Biol Reprod* 68:1333-1340. 2003.

ARCHAMBEAULT DR, YAO HH. Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107(23):10526-31. 2010.

ATASSANOVA NN, WALKER M, MCKINNELL C, FISHER JS, SHARPE RM. Evidence that androgens and oestrogens, as well as follicle-stimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *J Endocrinol* 184(1):107-117. 2005.

AUBRY F, HABASQUE C, SATIE AP, JEGOU B, SAMSON M. Expression and regulation of the CC-chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in rat testicular cells in primary cultures. *Biol Reprod* 62:1427-1435. 2000.

AUHAREK AS. Efeitos do hipo e hipertireoidismo neonatais sobre o desenvolvimento do testículo e dos diferentes tipos de espermatogônias, do nascimento à fase adulta, em camundongos C57BL/6. 94p. Dissertação - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, MG, Brasil. 2007.

AUHAREK AS, AVELAR GF, LARA NLM, SHARPE RM, FRANÇA LR. Sertoli cell numbers and spermatogenic efficiency are increased in inducible nitric oxide synthase mutant mice. *Int J Androl* 34(6,2):e621-e626. 2011.

AUHAREK AS, FRANÇA LR. Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J Anat* 216:577-588. 2010.

AUHAREK AS, LARA NLM, AVELAR GF, SHARPE RM, FRANÇA LR. Effects of inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficiency in mice on Sertoli cell proliferation and perinatal testis development. *Int J Androl* In press 2012.

BARDIN CW. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Eds). The Leydig cell. Viena: Cache River Press p.31-42. 1996.

BAUCHE F, STEPHAN JP, TOUZALIN AM, JEGOU B. *In vitro* regulation of an inducible-type NO synthase in the rat seminiferous tubule cells. Biol Reprod 58:431-438. 1998.

BERNDTSON WE, THOMPSON TL. Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. Journal of Andrology 11(5):429-435. 1990.

BHARDWAJ A, RAO MK, KAUR R, BUTTIGIEG MR, WILKINSON MF. GATA factors and androgen receptor collaborate to transcriptionally activate the Rhox5 homeobox gene in Sertoli cells. Mol Cell Biol 28:2138–2153. 2008.

BIELINSKA M, SEEHRA A, TOPPARI J, HEIKINHEIMO M, WILSON DB. GATA-4 is required for sex steroidogenic cell development in the fetal mouse. Dev Dyn 236:203-213. 2007.

BOUMA GJ, WASHBURN LL, ALBRECHT KH, EICHER EM. Correct dosage of Fog2 and Gata4 transcription factors is critical for fetal testis development in mice. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 104:14994-14999. 2007.

BREMNER WJ, MILLAR MR, SHARPE RM, SAUNDERS PT. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. Endocrinology 135(3):1227-1234. 1994.

BUZEK SW, SANBORN BM. Increase in testicular androgen receptor during sexual maturation in the rat. Biol Reprod 39:39-49. 1998.

BUZZARD JJ, WREFORD NG, MORRISON JR. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. Endocrinology 144:3722-3731. 2003.

CAIRES K, BROADY J, MCLEAN D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. J Endocrinol 205(2):133-145. 2010.

CAMPESE AF, GRAZIOLI P, DE CESARIS P, RICCIOLI A, BELLAVIA D, *et al.* Mouse Sertoli cells sustain de novo generation of regulatory T cells by triggering the notch pathway through soluble JAGGED1. Biol Reprod 90(3)53:1-10. 2014.

CAMPOS-JUNIOR PHA, COSTA GMJ, LACERDA SMSN, REZENDE-NETO JV, DE PAULA AM, HOFMANN MC, FRANÇA LR. The spermatogonial stem cell niche in the collared peccary (*Tayassu tajacu*). Biol of Reprod 86(5)155:1-10. 2012.

CARETTE D, WEIDER K, GILLERON J, GIESE S, DOMPIERRE J, BERGMANN M, BREHM R, DENIZOT JP, SEGRETAİN D, POINTIS G. Major involvement of connexin 43 in

seminiferous epithelial junction dynamics and male infertility. *Dev Biol* 346(1):54-67. 2010.

CASTRO ACS, CARDOSO FM, FRANÇA LR. Effects of puberty and sexual development on daily sperm production and epididymal sperm reserves on Piau boars. *Animal Reproduction Science*. 25:83-90. 1991.

CHARO IF, TAUBMAN MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 95:858-866. 2004.

CHATONNET F, LIVERA G, FUMEL B, FOUCHÉCOURTS S, FLAMANT F. Direct and indirect consequences on gene expression of a thyroid hormone receptor alpha 1 mutation restricted to Sertoli cells. *Mol Reprod Dev* 81(12):1159-1166. 2014

CHAUDHARY J, SADLER-RIGGLEMAN I, AGUE JM, SKINNER MK. The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce post-mitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate. *Biol Reprod* 72:1205-1217. 2005.

CHEN SR, LIU YX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli. *Reproduction*. p.1-28. 2014.

CHEN H, STANLEY E, JIN S, ZIRKIN BR. Stem Leydig cells: from fetal to aged animals. *Birth Defects Research Part C Embryo Today*, 90(4):272-283. 2010.

CHENG CY, MRUK DD. An intracellular trafficking pathway in the seminiferous epithelium regulating spermatogenesis: a biochemical and molecular perspective. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44:245-263. 2009.

CHENG CY, WONG EW, YAN HH, MRUK DD. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Mol Cell Endocrinol* 315:49-56. 2010.

CHUI K, TRIVEDI A, CHENG YC, CHERBAVAZ DB, DAZIN PF, HUYNH ALT, MITCHELL JB, RABINOVICH GA, NOBLE-HAEUSSLEIN LJ, JOHN CM. Characterization and functionality of proliferative human Sertoli cells. *Cell Transplant* 20(5):619-635. 2011.

COOKE PS, HESS RA, KIRBY JD. A model system for increasing testis size and sperm production: potential application to animal science. *J Anim Sci* 72:43-54. 1994.

COOKE PS, HOLSBERGER DR, FRANÇA LR. Thyroid hormone regulation of Sertoli Cell Development. In: *The Sertoli cell biology*. Skinner MK, Griswold MD (Eds). Elsevier Science U.S.A. p.217-226. 2005.

DE CESARIS P, FILIPPINI A, CERVELLI C, RICCIOLI A, MUCI S, STARACE G, STEFANINI M, ZIPARO E. Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured *in vitro*:

biological effects on lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 186:1639-1646. 1992.

DE GENDT K, SWINNEN JV, SAUNDERS PT, SCHOONJANS L, DEWERCHIN M, DEVOS A, TAN K, ATANASSOVA N, CLAESSENS F, LÉCUREUIL C, HEYNS W, CARMELIET P, GUILLOU F, SHARPE RM, VERHOEVEN G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci* 101:1327-1332. 2004.

DE KRETZER DM, LOVELAND KL, MEINHARDT, *et al.* Spermatogenesis. *Hum Reprod* 13:1-8. 1998.

DE ROOIJ DG, GRISWOLD MD. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J Androl* 33(6):1085-1095. 2012.

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

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

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

DING X, YANG DR, LEE SO, CHEN YL, XIA L, LIN SJ, YU S, NIU YJ, LI G, CHANG C. TR4 nuclear receptor promotes prostate cancer metastasis via upregulation of CCL2/CCR2 signaling. *Int J Cancer* 136(4):955-964. 2015.

DOMKE LM, RICKELT S, DÖRFLINGER Y, KUHN C, WINTER-SIMANOWSKI S, ZIMBELMANN R, ROSIN-ARBESFELD R, HEID H, FRANKE WW. The cell-cell junctions of mammalian testes: I. The adhering junctions of the seminiferous epithelium represent special differentiation structures. *Cell Tissue Res* 357(3):645-665. 2014.

DYM M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci* 91:11298-11302. 1994.

DUFOUR JM, RAJOTTE RV, KORBUTT GS, EMERICH DF. Harnessing the immunomodulatory properties of Sertoli cells to enable xenotransplantation in type I diabetes. *Immunol Invest* 32:275-297. 2003.

DUFOUR JM, THOMPSON LA, KAUR G. Therapeutic potential of immune privileged Sertoli cells. *Anim Reprod* 12(1):105-117. 2015.

EKWALL H, JANSSON A, SJOBERG P, *et al.* Differentiation of the rat testis between 20 and 120 days of age. *Archives of Andrology* 13(1):27-36. 1984.

- EL-ASMAR L, SPRINGAEL JY, BALLEST S, ANDRIEU EU, VASSART G, PARMENTIER M. Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers. *Mol Pharmacol* 67:460-469. 2005.
- FAN X, ROBAIRE B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology* 139:2128-2136. 1998.
- FAWCETT DW, NEAVES WB, FLORES MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 9(5):500-532. 1973.
- FLORY CM, JONES ML, MILLER BF, WARREN JS. Regulatory roles of tumor necrosis factor-1alpha and interleukin-1beta in monocyte chemoattractant protein-1-mediated pulmonary granuloma formation in the rat. *Am J Pathol* 146:450-462. 1995.
- FORD LB, CEROVIC V, MILLING SWF, GRAHAM GJ, HANSELL CAH, NIBBS RJB. Characterization of Conventional and Atypical Receptors for the Chemokine CCL2 on Mouse Leukocytes. *The Journal of Immunology* 193(1):400-411. 2014.
- FRAGALE A, PUGLISI R, MORENA AR, STEFANINI M, BOITANI C. Age-dependent activin receptor expression pinpoints activin A as a physiological regulator of rat Sertoli cell proliferation. *Mol Hum Reprod* 7:1107-1114. 2001.
- FRANÇA, LR. Desenvolvimento testicular de suínos da raça Piau, do nascimento aos 12 meses de idade. 78p. Dissertação - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, MG, Brasil. 78p. 1987.
- FRANÇA LR, AUHAREK SA, HESS RA, DUFOUR JM, HINTON BT. Morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and blood-epididymal barriers. In: *Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers* (Cheng CY, Ed) In press, Landes Bioscience, Austin, TX. 2011.
- FRANÇA LR, AUHAREK SA, HESS RA, DUFOUR JM, HINTON BT. Blood-tissue barriers: morphofunctional and immunological aspects of the blood-testis and blood-epididymal barriers. *Adv Exp Med Biol* 763:237-259. 2012.
- FRANÇA LR, AVELAR GF, ALMEIDA FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63:300-318. 2005.
- FRANÇA LR, HESS RA, COOKE PS, RUSSELL LD. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec* 242:57-69. 1995.
- FRANÇA LR, OGAWA, T, AVARBOCK, MR, BRINSTER, RL, RUSSELL, LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 59:1371-1377. 1998.

FRANÇA LR, RUSSELL LD. The testis of domestic animals. In: REGADERA J, GARCIA M (Eds). Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Livingstone. p.197-219. 1998.

FRANÇA LR, SILVA-JR VA, CHIARINI-GARCIA H, *et al.* Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction* 63(6):1629-1636. 2000.

FRAVE N, CAMPS M, AROD C, CHABERT C, ROMMEL C, PASQUALI C. Chemokine receptor CCR2 undergoes transportin1-dependent nuclear translocation. *Proteomics* 8(21):4560-4576. 2008.

FUJINO M, MIURA S, MATSUO Y, TANIGAWA H, KAWAMURA A, SAKU K. Pitavastatin-induced downregulation of CCR2 and CCR5 in monocytes is associated with the arrest of cell-cycle in S phase. *Atherosclerosis* 187:301-308. 2006.

GAO Y, LEE WM, CHENG CY. Thyroid hormone function in the rat testis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5(5):188:1-7. 2014.

GAO J, WANG A, ZHANG M, LI H, WANG K, HAN Y, WANG Z, SHI C, WANG W. RNAi targeting of CCR2 gene expression in duces apoptosis and inhibits the proliferation, migration, and invasion of PC-3M cells. *Oncol Res* 21(2):73-82. 2013.

GAYRABEDYAN S, TODOROVA K, PASHOVA S, MOLLOVA M, FERNÁNDEZ N. Sertoli cell quiescence – new insights. *J Reprod Immunol* 68(6):451-455. 2012.

GERDPRASERT O, O'BRYAN MK, NIKOLIC-PATERSON DJ, SEBIRE K, DE KRETZER DM, HEDGER MP. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor in normal and inflamed rat testis. *Mol Hum Reprod* 8:518-524. 2002.

GILLERON J, NEBOUT M, SCARABELLI L, SENEGAS-BALAS F, PALMERO S, SEGRETAIN D, POINTIS G. A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of Sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol* 209(1):153-161. 2006.

GOYAL SR, TALIB VH, KHURANA SK. An overview of PSA/free PSA with special reference to recent trends in diagnosis of prostatic cancer. *Indian J Pathol Microbiol* 42:171-178. 1999.

GRISWOLD M. Protein secretions of Sertoli cells. *Int Rev Cytol* 110:133-156. 1988.

GRISWOLD M. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell & Development Biology* 9:411-416. 1998.

GU L, RUTLEDGE B, FIORILLO J, ERNST C, GREWAL I, FLAVELL R, *et al.* In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leukoc Biol* 62:577-580. 1997.

GUAZZONE VA, JACOBO P, DENDUCHIS B, LUSTIG L. Expression of cell adhesion molecules, chemokines and chemokine receptors involved in leukocyte traffic in rats undergoing autoimmune orchitis. *Reproduction* 143:651-662. 2012.

GUAZZONE VA, JACOBO P, THEAS MS, LUSTIG L. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: a brief review. *Microsc Res Tech* 72:620-628. 2009.

GUAZZONE VA, RIVAL C, DENDUCHIS B, LUSTIG L. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in experimental autoimmune orchitis. *J Reprod Immunol* 60:143-157. 2003.

HAZRA R, CORCORAN L, ROBSON M, MCTAVISH KJ, UPTON D, *et al.* Temporal role of Sertoli cell androgen receptor expression in spermatogenic development. *Mol Endocrinol* 27:12-24. 2013.

HE S, HE S, CHEN CH, DEBORDE S, BAKST RL, CHERNICHENKO N, MCNAMARA WF, LEE SY, BARAJAS F, YU Z, AL-AHMADIE HM, WONG RJ. The chemokine (CCL2-CCR2) signaling axis mediates perineural invasion. *Mol Cancer Research* (pii: molcanres.0303). 2014.

HECKERT LL, GRISWOLD MD. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 57:129-148. 2002.

HEINLEIN CA, CHANG C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23(2):175-200. 2002.

HERMO L, DWORKIN J. Transitional cells at the junction of seminiferous tubules with the rete testis of the rat: their fine structure, endocytic activity, and basement membrane. *The American Journal of Anatomy* 181:111-131. 1988.

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

HESS RA, FRANÇA LR. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: CHENG, CY (Ed). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, N.Y. Landes Bioscience. 2007.

HOFMANN MC. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol* 288:95-103. 2008.

HOFMANN MC, BRAYDICH-STOLLE L, DYM M. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev Biol* 279(1):114-124. 2005.

HOGARTH CA, GRISWOLD MD. Driving asynchronous spermatogenesis: is retinoic acid the answer?. *Anim Reprod* 9(4):742-750. 2012.

HOLSBERGER DR, BUCHOLD GM, LEAL MC, *et al.* Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biology of Reproduction* 72(6):1429-1436. 2005.

HOLSBERGER DR, COOKE PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell and Tissue Research* 322(1):133-140. 2005.

HUANG DR, WANG J, KIVISAKK P, ROLLINS BJ, RANSOHOFF RM. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 193:713-726. 2001.

IMAI T, KAWAI Y, TADOKORO Y, YAMAMOTO M, NISHIMUNE Y, YOMOGIDA K. *In vivo* and *in vitro* constant expression of GATA-4 in mouse postnatal Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 214:107-115. 2004.

IWAMORI N. Regulation of spermatogonial stem cell compartment in the mouse testis. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 105(1):1-10. 2014.

JIANG XH, BUKHARI I, ZHENG W, YIN S, WANG Z, COOKE HJ, SHI QH. Blood-testis barrier and spermatogenesis: lessons from genetically-modified mice. *Asian J Androl* 16(4):572-580. 2014.

JOHNSON L, SUGGS LC, NORTON YM, ZEH WC. Effect of developmental age or time after transplantation on Sertoli cell number and testicular size in inbred Fischer rats. *Biol Reprod* 54:948-959. 1996.

JOHNSON L, THOMPSON DL. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biology of Reproduction* 29(3):777-789. 1983.

JOHNSON L, VARNER DD, TATUM ME, SCRUTCHFIELD WL. Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions. *Biol Reprod* 45:404-410. 1991.

JOHNSTON H, BAKER PJ, ABEL M, CHARLTON HM, JACKSON G, FLEMING L, KUMAR TR, O'SHAUGHNESSY PJ. Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology* 145(1):318-329. 2004.

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

KANATSU-SHINOHARA M, SHINOHARA T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29:163-187. 2013.

KAUR G, THOMPSON LA, DUFOUR JM. Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 30:36-44. 2014.

KAZUTAKA S, WINNALL WR, MUIR JA, HEDGER MP. Regulation of Sertoli cell activin A and inhibin B by tumour necrosis factor alpha and interleukin 1alpha: interaction with follicle-stimulating hormone/adenosine 30,50- cyclic phosphate signalling. *Mol Cell Endocrinol* 335:195-203. 2011.

KELLER ET, ERSHLER WB, CHANG C. The androgen receptor: a mediator of diverse responses. *Front Biosci* 1:59-71. 1996.

KETOLA I, ANTTONEN M, VASKIVUO T, TEPANAINEN JS, TOPPARI J, HEIKINHEIMO M. Developmental expression and spermatogenic stage specificity of transcription factors GATA-1 and GATA-4 and their cofactors FOG-1 and FOG-2 in the mouse testis. *Eur J Endocrinol* 147:397-406. 2002.

KETOLA I, RAHMAN N, TOPPARI J, BIELINSKA M, PORTER-TINGE SB, TAPANAINEN JS, HUHTANIEMI IT, WILSON DB, HEIKINHEIMO M. Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology* 140:1470-1480. 1999.

KIM S, BARDWELL VJ, ZARKOWER D. Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for *Dmrt1* in postnatal testis differentiation. *Dev Biol* 307:314-327. 2007.

KLIESCH S, BERGMANN M, HERTLE L, NIESCHLAG E, BEHRE HM. Semen parameters and testicular pathology in men with testicular cancer and contralateral carcinoma in situ or bilateral testicular malignancies. *Hum Reprod* 12:2830-2835. 1997.

KLUIN PM, KRAMER MF, DE ROOIJ DG. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat Embryol (Berl)* 169:73-78. 1984.

KOJIMA Y, HAYASHI Y, MIZUNO K, SASAKI S, FUKUI Y, KOOPMAN P, MOROHASHI K, KOHRI K. Up-regulation of *SOX9* in human sex-determining region on the Y chromosome (*SRY*)-negative XX males. *Clin Endocrinol* 68:791-799. 2008.

KOKKINAKI M, LEE TL, HE Z, JIANG J, GOLESTANEH N, HOFMANN MC, CHAN WY, DYM M. The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod* 80(4):707-717. 2009.

KOPERA IA, BILINSKA B, CHENG CY, MRU DD. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 27:1593-1605. 2010.

KORBUTT GS, SUAREZ-PINZON WL, POWER RF, RAJOTTE RV, RABINOVITCH A. Testicular Sertoli cells exert both protective and destructive effects on syngeneic islet grafts in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 43:474-480. 2000.

KUBOTA Y, NEF S, FARMER PJ, TEMELCOS C, PARADA LF, HUTSON JM. Leydig Insulin-like hormone, gubernacular development and testicular descent. *The Journal of Urology* 165(5):1673-1675. 2001.

KYRÖNLAHTI A, EULER R, BIELINSKA M, SCHOELLER EL, MOLEY KH, TOPPARI J, HEIKINHEIMO M, WILSON DB. GATA4 regulates Sertoli cell function and fertility in adult male mice. *Mol Cell Endocrinol* 333(1):85-95. 2011.

LARA, NLM. Avaliação estrutural e funcional dos testículos de camundongos adultos controles e deficientes para iNOS, tratados ou não com propil-tiouracil durante o período pós-natal. Dissertação - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, MG, Brasil. 70p. 2014.

LAVOIE HA. The role of GATA in mammalian reproduction. *Exp Biol Med* 228:1282–1290. 2003.

LAVOIE HA, KING SR. Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med* 234:880-907. 2009.

LAVOIE HA, MCCOY GL, BLAKE CA. Expression of the GATA-4 and GATA-6 transcription factors in the fetal rat gonad and in the ovary during postnatal development and pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 227:31-40. 2004.

LEE J, KANATSU-SHINOHARA M, INOUE K, Ogonuki N, MIKI H, TOYOKUNI S, KIMURA T, NAKANO T, OGURA A, SHINOHARA T. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development* 134:1853-1859. 2007.

LEI N, HECKERT LL. Gata4 regulates testis expression of Dmrt1. *Mol Cell Biol* 24:377-388. 2004.

LI MW, XIA W, MRUK DD, WANG CQ, YAN HH, SIU MK, LUI WY, LEE WM, CHENG CY. Tumor necrosis factor {alpha} reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *J Endocrinol* 190:313-329. 2006.

LOBERG RD, DAY LL, HARWOOD J, YING C, ST JOHN LN, GILES R, *et al.* CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia* 8:578-586. 2006.

LOBERG RD, TANTIVEJKUL K, CRAIG M, NEELEY CK, PIENTA KJ. PAR1-mediated RhoA activation facilitates CCL2-induced chemotaxis in PC-3 cells. *J Cell Biochem* 101:1292-1300. 2007.

LU Y, CAI Z, XIAO G, LIU Y, KELLER ET, YAO Z, ZHANG J. CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 101(3):676-685. 2007.

- LU Y, CHEN Q, COREY E, XIE W, FAN J, MIZOKAMI A, *et al.* Activation of MCP-1/CCR2 axis promotes prostate cancer growth in bone. *Clin Exp Metastasis* 26(2):161-169. 2009.
- LU B, RUTLEDGE BJ, GU L, FIORILLO J, LUKACS NW, KUNKEL SL, NORTH R, GERARD C, ROLLINS BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 187(4):601-608. 1998.
- LUCAS TF, NASCIMENTO AR, PISOLATO R, PIMENTA MT, LAZARI MF, PORTO CS. Receptors and signaling pathways involved in proliferation and differentiation of Sertoli cells. *Spermatogenesis* 20;4e28138. 2014.
- LUI WY, MRUK D, LEE WM, CHENG CY. Sertoli cell tight junction dynamics: Their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod* 68:1087-1097. 2003.
- MANUYLOV NL, FUJIWARA Y, ADAMEYKO II, POULAT F, TEVOSIAN SG. The regulation of Sox9 gene expression by the GATA4/FOG2 transcriptional complex in dominant XX sex reversal mouse models. *Dev Biol* 307:356-367. 2007.
- MANUYLOV NL, ZHOU B, MA Q, FOX SC, PU WT, & TEVOSIAN SG. Conditional ablation of Gata4 and Fog2 genes in mice reveals their distinct roles in mammalian sexual differentiation. *Developmental Biology* 353:229-241. 2011.
- MARK M, TELETIN M, VERNET N, GHYSELINCK NB. Role of retinoic acid receptor (RAR) signaling in post-natal male germ cell differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1849(2):84-93. 2015.
- MARTIN LJ, BERGERON F, VIGER RS, TREMBLAY JJ. Functional cooperation between GATA factors and cJUN on the Star promoter in MA-10 Leydig cells. *Journal of Andrology* 33:81-87. 2012.
- MATTHIESSON KL, MCLACHLAN RI, O'DONNELL L, FRYDENBERG M, ROBERTSON DM, STANTON PG, *et al.* The relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3962-3969. 2006.
- MCCOARD SA, WISE TH, FAHRENKRUG SC, FORD JJ. 2001. Temporal and spatial localization patterns of Gata4 during porcine gonadogenesis. *Biol Reprod* 65:366-374. 2001.
- MCLACHLAN RI, O'DONNELL L, MEACHEM SJ, STANTON PG, DE KRETZER DM, PRATIS K, *et al.* Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 57:149-179. 2002.
- MCLACHLAN RI, WREFORD NG, DE KRETZER DM, ROBERTSON DM. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the

- gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology* 136:4035-4043. 1995.
- MEACHEM SJ, RUWANPURA SM, ZIOLKOWSKI J, AGUE JM, SKINNER MK, LOVELAND KL. Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *J Endocrinol* 186:429-446. 2005.
- MEISAMI E, SENDERA, TJ, CLAY LB. Paradoxical hypertrophy and plasticity of the testis in rats recovering from early thyroid deficiency: a growth study including effects of age and duration of hypothyroidism. *Journal of Endocrinology* 135(3):495-505. 1992.
- MEISTRICH ML, MOHAPATRA B, SHIRLEY CR, ZHAO M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111:483-488. 2003.
- MENTEN P, WUYTS A, VAN DAMME J. Monocyte chemotactic protein-3. *Eur Cytokine Netw* 12:554-560. 2001.
- MENZIES FM, KHAN AH, HIGGINS CA, NELSON SM, NIBBS JBR. The Chemokine Receptor CCR2 is not required for successful initiation of labor in mice. *Biol Reprod* 86(4):118:1-7. 2012.
- MITAL P, DUFOUR JM, KAUR G, BOWLIN B, PANIAGUA NJ, KORBUTT GS. Nondividing, postpubertal rat Sertoli cells resumed proliferation after transplantation. *Biol Reprod* 90(1):13:1-10. 2014.
- MITAL P, HINTON BT, DUFOUR JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod* 84:851-858. 2011.
- NAKAGAWA T, SHARMA M, NABESHIMA Y, BRAUN RE, YOSHIDA S. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science* 328(5974):62-67. 2010.
- NISHIDA H, MIYAGAWA S, VIEUX-ROCHAS M, MORINI M, OGINO Y, SUZUKI K, NAKAGATA N, CHOI HS, LEVI G, YAMADA G. Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression through the interaction between Dlx and GATA-4 for testicular steroidogenesis. *Endocrinology* 149:2090-2097. 2008.
- NYKÄNEN M. Fine structure of the transitional zone of the rat seminiferous tubule. *Cell Tissue Res* 198:441-454. 1979.
- OATLEY JM, BRINSTER RL. The germline stem cell niche unit in Mammalian testes. *Physiol Rev* 92(2):577-595. 2012.
- O'DONNELL L, MCLACHLAN RI, WREFORD NG, DE KRETZER DM, ROBERTSON DM. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 55:895-901. 1996.

- O'DONNELL L, PRATIS K, WAGENFELD A, GOTTWALD U, MULLER J, *et al.* Transcriptional profiling of the hormone-responsive stages of spermatogenesis reveals cell-,stage-, and hormone-specific events. *Endocrinology* 150:5074-5084. 2009.
- O'DONNELL L, STANTON PG, BARTLES JR, ROBERTSON DM. Sertoli cell ectoplasmic specializations in the seminiferous epithelium of the testosterone-suppressed adult rat. *Biol Reprod* 63:99-108. 2000.
- O'HARA L, MCINNES K, SIMITSIDELLIS I, MORGAN S, ATANASSOVA N, SLOWIKOWSKA-HILCZER K, KULA K, SZARRAS-CZAPNIK M, MILNE L, MITCHELL RT, SMITH LB. Autocrine androgen action is essential for Leydig cell maturation and function, and protects against late-onset Leydig cell apoptosis in both mice and men. *FASEB J.* p.1-17. 2014.
- OKUMA Y, O'CONNOR AE, MUIR JA, STANTON PG, DE KRETZER DM, HEDGER MP. Regulation of activin A and inhibin B secretion by inflammatory mediators in adult rat Sertoli cell cultures. *J Endocrinol* 187:125-134. 2005.
- OLIVEIRA, CFA. Estudo comparado da função testicular de camundongos adultos BALB/c selvagens e portadores de mutação nos genes *Foxn1* e *Prkdc*. Dissertação - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, MG, Brasil. 82p. 2014.
- OREAL E, MAZAUD S, PICARD JY, MAGRE S, CARRE-EUSEBE D. Different patterns of anti-Mullerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1 GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads. *Dev Dyn* 225:221-232. 2002.
- ORTH JM. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203:485-492. 1982.
- ORTH JM. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinol* 115:1248-1255. 1984.
- ORTH JM. Cell biology of testicular development in the fetus and neonate. In: *Cell and molecular biology of the testis*. DESJARDINS C, EWING LL (Eds). Oxford University Press, N.Y. p.3-42. 1993.
- ORTH JM, GUNSALUS GM, LAMPERTI AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid numbers in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinol* 122:787-794. 1988.
- OSMAN DI. On the histochemistry of the seminiferous tubules and their terminal segments in the ram testis. *Anat Histol Embryol* 13:319-326. 1984.
- OSMAN DI, PLOEN L. The Mammalian tubuli recti: ultrastructural study. *Anat Rec* 192: 1-18. 1978.

PEASE D. Histological techniques for electron microscopy. 2nd ed. Academic Press, N.Y. p.381. 1964.

PELLINIEMI LJ, KUOPIO T, FROJDMAN K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE AH, HARDY MP, RUSSELL LD (Eds). The Leydig Cell. Ed. Cache River Press, Vienna, p.143-157. 1996.

PEREY B, CLERMONT Y, LEHLOND CP. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *J Anat* 108:47-78. 1961.

PÉREZ CV, PELLIZZARI EH, CIGORRAGA SB, GALARDO MN, NAITO M, LUSTIG L, JACOBO PV. IL17A impairs blood–testis barrier integrity and induces testicular inflammation. *Cell Tissue Res* 358:885-898. 2014.

PÉREZ CV, SOBARZO CM, JACOBO PV, PELLIZZARI EH, CIGORRAGA SB, DENDUCHIS B, LUSTIG L. Loss of occludin expression and impairment of blood-testis barrier permeability in rats with autoimmune orchitis: effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions. *Biol Reprod* 87(5):122:1-12. 2012.

PÉREZ CV, THEAS MS, JACOBO PV, JARAZO-DIETRICH S, GUAZZONE VA, LUSTIG L. Dual role of immune cells in the testis: protective or pathogenic for germ cells? *Spermatogenesis* 3:e23870. 2013.

PETERSEN C, BOITANI C, FROYSA B, SODER O. Interleukin-1 is a potent growth factor for immature rat sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 186:37-47. 2002.

PETERSEN C, FROYSA B, SODER O. Endotoxin and proinflammatory cytokines modulate Sertoli cell proliferation in vitro. *J Reprod Immunol* 61:13-30. 2004.

PHILLIPS BT, GASSEI K, ORWIG KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1546):1663-1678. 2010.

PLANT TM, MARSHALL GR. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocrine Reviews* 22(6):764-786. 2001.

PODANY J. Testicular biometry in boars. *Acta Veterinaria (Belgrade)* 38:215-221. 1969.

PROOST P, WUYTS A, VAN DAMMEN, J. The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res* 26:211-223. 1996.

RAYMOND CS, MURPHY MW, O’SULLIVAN G, BARDWELL VJ, Zarkower D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 14:2587-2595. 2000.

REBOURCET D, O’SHAUGHNESSY PJ, MONTEIRO A, MILNE L, CRUICKSHANKS L, JEFFREY N, GUILLOU F, FREEMAN TC, MITCHELL RT, SMITH LB. Sertoli cells maintain Leydig cell

number and peritubular myoid cell activity in the adult mouse testis. PLoS One. 9(8):e105687. 2014.

REGADERA J, MARTÍNEZ-GARCÍA F, GONZALEZ-PERAMATO P, *et al.* Androgen receptor expression in Sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. J Clin Endocrinol Metab 86:413-421. 2001.

REYNOLDS ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17:208-213. 1963.

RIVAL C, GUAZZONE VA, VON WULFFEN W, HACKSTEIN H, SCHNEIDER E, LUSTIG L, MEINHARDT A, FIJAK M. Expression of co-stimulatory molecules, chemokine receptors and proinflammatory cytokines in dendritic cells from normal and chronically inflamed rat testis. Molecular Human Reproduction 13(12):853-861. 2007.

RIVAL C, LUSTIG L, IOSUB R, GUAZZONE VA, SCHNEIDER E, MEINHARDT A, FIJAK M. Identification of a dendritic cell population in normal testis and in chronically inflamed testis of rats with autoimmune orchitis. Cell Tissue Res 324:311-318. 2006.

ROBAIRE B, VIGER RS. Regulation of epididymal epithelial cell functions. Biol of Reproduction 52:226-236. 1995.

ROCA H, VARSOS Z, PIANTA KJ. CCL2 protects prostate cancer PC3 cells from autophagic death via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent surviving up-regulation. J Biol Chem 283:25057-25073. 2008.

ROOSEN-RUNGE EC. The *rete testis* in the albino rat: its structure, development and morphological significance. Acta Anat (Basel) 45:1-30. 1961.

ROSSI P, DOLCI S. Paracrine mechanisms involved in the control of early stages of Mammalian spermatogenesis. Front Endocrinol (Lausanne) 26(4):181:1-8. 2013.

ROY AK, LAVROVSKY Y, SONG CS, *et al.* Regulation of androgen action. Vitam Horm 55:309-352. 1999.

RUSSEL LD. Normal development of the testis. In: MOHR U, DUNGWORTH DL, CAPEN CC (Ed). Pathobiology of the aging rat, Washington, ILSI Press, 1:395-405. 1992.

RUSSEL LD, BARTKE A, GOH JC. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. American Journal of Anatomy 184(3):179-189. 1989.

RUSSELL LD, CLERMONT Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. Anat Rec 187:347-366. 1977.

- RUSSELL LD, CORBIN TJ, BORG KE, *et al.* Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology* 133:2062-2070. 1993.
- RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED. In: Histological and histopathological evaluation of the testis. RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED, editor. Clearwater: Cache River Press. 1990.
- RUSSELL LD, GRISWOLD MD. The Sertoli cell (1 ed). Clearwater: Cache River Press. 1993.
- RUSSELL LD, SINHA-HIKIM AP, GHOSH S, *et al.* Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE, A (Ed). Function of somatic cells in the testis. N.Y. Springer-Verlag. P.55-84. 1994.
- RUSSELL LD, WARREN J, DEBELJUK L, *et al.* Spermatogenesis in Bclw-deficient mice. *Biology of Reproduction* 65(1):318-332. 2001.
- SANBERG PR, BORLONGAN CV, SAPORTA S, CAMERON DF. Testis-derived Sertoli cells survive and provide localized immunoprotection for xenografts in rat brain. *Nat Biotechnol* 14:1692-1695. 1996.
- SARAFI M, GARCIA-ZEPEDA E, MACLEAN J, CHARO I, LUSTER A. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J Exp Med* 185(1):99-109. 1997.
- SARKAR O, MATHUR PP, CHENG CY, MRUK DD. Interleukin-1 $\alpha$  (IL1A) is a novel regulator of the blood-testis barrier in the rat. *Biol Reprod* 78:445-454. 2008.
- SELZMAN CH, MILLER SA, ZIMMERMAN MA, *et al.* Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation. *Am J Physiol* 283:H1455-61. 2002.
- SCOTT HM, HUTCHISON GR, JOBLING MS, MCKINNELL C, DRAKE AJ, SHARPE RM. Relationship between androgen action in the "male programming window," fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology* 149(10):5280-5287. 2008.
- SCOTT HM, HUTCHISON GR, MAHOOD KI, HALLMARK N, WELSH M, DE GENDT K, VERHOEVEN G, O'SAUGHNESSY P, SHARPE RM. Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. *Endocrinology* 148(5):2027-2036. 2007.
- SELAWRY HP, KOTB M, HERROD HG, LU ZN. Production of a factor, or factors, suppressing IL-2 production and T cell proliferation by Sertoli cell-enriched preparations. A potential role for islet transplantation in an immunologically privileged site. *Transplantation* 52:846-850. 1991.

- SETCHELL BP, BREED WG. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: NEILL JD (Ed), Physiology of Reproduction. Elsevier 771-825. 2006.
- SHAMEKH R, EL-BADRI NS, SAPORTA S, PASCUAL C, SANBERG PR, CAMERON DF. Sertoli cells induce systemic donor-specific tolerance in xenogenic transplantation model. Cell Transplant 15:45-53. 2006.
- SHARPE RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL E, NEIL JD. (Eds). The physiology of reproduction. N.Y. Raven Press, p.1363-1434. 1994.
- SHARPE RM, MCKINNELL C, KIVLIN C, FISHER JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reproduction 125:769-784. 2003.
- SHECKTER CB, MATSUMOTO AM, BREMNER WJ. Testosterone administration inhibits gonadotropin secretion by an effect directly on the human pituitary. J Clin Endocrinol Metab 68:397-401. 1989.
- SILVERMAN E, YIVGI-OHANA N, SHER N, BELL M, EIMERL S, ORLY J. Transcriptional activation of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: GATA-4 and CCAAT/enhancer-binding protein beta confer synergistic responsiveness in hormone-treated rat granulosa and HEK293 cell models. Mol Cell Endocrinol 252:92-101. 2006.
- SIMON L, EKMAN GC, GARCIA T, CARNES K, ZHANG Z, MURPHY T, MURPHY KM, HESS RA, COOKE PS, HOFMANN MC. ETV5 regulates Sertoli cell chemokines involved in mouse stem/progenitor spermatogonia maintenance. Stem Cells 28(10):1882-1892. 2010.
- SIU MK, CHENG CY. Extracellular matrix and its role in spermatogenesis. Adv Exp Med Biol 636:74-91. 2008.
- SIU MK, LEE WM, CHENG CY. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor-alpha, gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. Endocrinology 144:371-387. 2003.
- SMITH LB, WALKER WH. The regulation of spermatogenesis by androgens. Semin Cell Dev Biol. 30:2-13. 2014.
- SOFIKITIS N, GIOTITSAS N, TSOUNAPI P, BALTOGIANNIS D, GIANNAKIS D, PARDALIDIS N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. J of Steroid Biochemistry & Mol Biology 109:323-330. 2008.
- SOHY D, PARMENTIER M, SPRINGAEL JY. Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. J Biol Chem 282:30062-30069. 2007.

- SOHY D, YANO H, DE NADAI P, URIZAR E, GUILLABERT A, JAVITCH JA, PARMENTIER M, SPRINGAEL JY. Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of “selective” antagonists. *J Biol Chem* 284:31270-31279. 2009.
- SONG HW, WILKINSON MF. Transcriptional control of spermatogonial maintenance and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 30:14-26. 2014.
- SOZZANI S, ZHOU D, LOCATI M, RIEPPI M, PROOST P, MAGAZIN M, VITA N, VAN DAMME J, MANTOVANI A. Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1. *J Immun* 152(7):3615-3622. 1994.
- SPINNLER K, KÖHN FM, SSCHWARZER U, MAYERHOFER A. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum Reprod* 25(9):2181-2187. 2010.
- SPRINGAEL JY, LE MINH PN, URIZAR E, COSTAGLIOLA S, VASSART G, PARMENTIER M. Allosteric modulation of binding properties between units of chemokine receptor homo- and hetero-oligomers. *Mol Pharmacol* 69:1652-1661. 2006.
- SRIDHARAN S, SIMON L, MELING DD, CYR DG, GUTSTEIN DE, FISHMAN GI, GUILLOU F, COOKE PS. Proliferation of adult Sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod* 76:804-812. 2007.
- STANTON PG, SLUKA P, FOO CF, STEPHENS AN, SMITH AI, *et al*. Proteomic changes in rat spermatogenesis in response to *in vivo* manipulation; impact on meiotic cells. *PLoS One* 7:e41718. 2012.
- STEGER K, REY R, KLIESCH S, LOUIS F, BERGMANN M, SCHLEICHER G. Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *Int J Androl* 19:122-128. 1996.
- STEGER K, REY R, KLIESCH S, LOUIS F, NIESCHLAG E, BEHRE HM, *et al*. Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum Reprod* 14:136-143. 1999.
- STEINBERGER A, STEINBERGER E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis *in vivo* and organ culture. *Biol Reprod* 4:84-87. 1971.
- STEINMAN RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-296. 1991.
- STEINMAN RM, HAWIGER D, NUSSENZWEIG MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711. 2003.

ST-PIERRE N, DUFRESNE J, ROONEY AA, CYR DG. Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. *Biol Reprod* 68:1232-1240. 2003.

SUAREZ-PINZON W, KORBUTT GS, POWER R, HOOTON J, RAJOTTE RV, RABINOVITCH A. Testicular sertoli cells protect islet beta-cells from autoimmune destruction in NOD mice by a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism. *Diabetes* 49:1810-1818. 2000.

SUÁREZ-QUIAN CA, MARTÍNEZ-GARCÍA F, NISTAL M, REGADERA J. Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 84:350-358. 1999.

SUGIMOTO R, NABESHIMA Y, YOSHIDA S. Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mech Dev* 128(11-12):610-624. 2012.

SUN Y, YANG W, LUO H, WANG X, CHEN Z, ZHANG J, WANG Y, LI X. Thyroid hormone inhibits the proliferation of piglet Sertoli cell via PI3K signaling pathway. *Theriogenology*. 83(1):86-94. 2015.

SWIERSTRA EE. Influence of breed, age, and ejaculation frequency on boars semen composition. *Canadian Journal of Animal Science* 53:43-53. 1973.

TAKAHASHI K, NAITO M, TERAYAMA H, QU N, CHENG L, TAINOSHO S, ITOH M. Immunomorphological aspects of the tubuli recti and the surrounding interstitium in normal mice. *International J Androl* 30:21-27. 2006.

TAN KA, DE GENDT K, ATANASSOVA N, WALKER M, SHARPE RM, SAUNDERS PT, DENOLET E, VERHOEVEN G. The role of androgen in Sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of androgen receptor. *Endocrinology* 146(6):2674-2683. 2005.

TANELI F, VATANSEVER S, ULMAN C, YILMAZ O, GIRAV G, GENÇ A, TANELI C. The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell-specific apoptosis in rat testis. *Acta HistoChem* 106:459-466. 2005.

TARULLI GA, STANTON PG, LERCHL A, MEACHEM SJ. Adult Sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: Effect of FSH on proliferation and junction protein organization. *Biol Reprod* 74:798-806. 2006.

TARULLI GA, STANTON PG, MEACHEM SJ. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol Reprod* 87(13):1-11. 2012.

TARULLI GA, STANTON PG, MEYTS ER, LOVELAND KL, MCLACHLAN RI, MEACHEM SJ. A survey of Sertoli cell differentiation in men after gonadotropin suppression and in testicular cancer. *Spermatogenesis* 1;3(1):e24014. 2013.

TEERDS KJ, KEIJER J. Reduced fetal androgen exposure compromises Leydig cell function in adulthood. <http://www.ajandrology.com/preprintarticle.asp?id=143249>; DOI: 10.4103/1008-682X.143249. Asian J Androl. 2014.

TEVOSIAN SG. Transgenic mouse models in the study of reproduction: insights into GATA protein function. *Reproduction* 148:R1-R14. 2014.

TEVOSIAN SG, ALBRECHT KH, CRISPINO JD, FUJIWARA Y, EICHER EM, ORKIN SH. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129:4627–4634. 2002.

THOMAS R, LIPSKY PE. Could endogenous self-peptides presented by dendritic cells initiate rheumatoid arthritis? *Immunol Today* 17:559-564. 1996.

TREMBLAY JJ, VIGER RS. Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol Endocrinol* 13:1388-1401. 1999.

TRIVEDI A, HUYNH A, HEMENDINGER R, NOBLE-HAEUSSLEIN L, JOHN CM. Isolation of proliferative human Sertoli cells. Society for Neuroscience Meeting, San Diego, CA. 2007.

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

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

VIGER RS, GUITTOT SM, ANTONEN M, WILSON DB, HEIKINHEIMO M. Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease. *Mol Endocrinol* 22:781-798. 2008.

VIGER RS, MERTINEIT C, TRASLER JM, NEMER M. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Development* 125:2665-2675. 1998.

VIRTANEN HE, TOPPARI J. Embryology and physiology of testicular development and descent. *Pediatr Endocrinol Rev* 2:206-13. 2014.

VOOG J, JONES DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell* 6(2):103-115. 2010.

WATANABE, CLARKE TR, LANE AH, WANG X, DONAHOE PK. Endogenous expression of Mullerian inhibiting substance in early postnatal rat Sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4 binding sites. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97:1624-1629. 2000.

WATSON ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 4:475-478. 1958.

WEBER KS, NELSON NJ, GRONE HJ, WEBER C. Expression of CCR2 by endothelial cells: implications for MCP-1-mediated wound injury repair and in vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2085-2093. 1999.

WELSH M, SAUNDERS PT, ATANASSOVA N, SHARPE RM, SMITH LB. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *23(12):4218-4230. FASEB J.* 2009.

WILLEMS A, BATLOUNI SR, ESNAL A, SWINNEN JV, SAUNDERS PTK, SHARPE RM, FRANÇA LR, DE GENDT K, VERHOEVEN, G. Selective ablation of the androgen receptor in mouse Sertoli cells affects Sertoli cells maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PLoS One* 5:e14168. 2010.

WING TY, CHRISTENSEN AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat* 165:13-25. 1982.

WONG EW, CHENG CY. NC1 domain of collagen  $\alpha 3$ (IV) derived from the basement membrane regulates Sertoli cell blood-testis barrier dynamics. *Spermatogenesis* 3:e25465. 2013.

WYATT CR, LAW L, MAGNUSON JA, GRISWOLD MD, MAGNUSON NS. Suppression of lymphocyte proliferation by proteins secreted by cultured Sertoli cells. *J Reprod Immunol* 14:27-40. 1988.

YANG QE, OATLEY JM. Spermatogonial stem cell functions in physiological and pathological conditions. *Curr Top Dev Biol* 107:235-267. 2014.

YOSHIDA S. Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. *Reproduction* 144(3):293-302. 2012.

ZHANG J, LU Y, PIENTA KJ. Multiple roles of chemokine (C-C motif) ligand 2 in promoting prostate cancer growth. *J Natl Cancer Inst* 102:522-528. 2010a.

ZHANG J, PATEL L, PIENTA KJ. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:41-48. 2010b.

ZHENGWEI Y, WREFORD NG, ROYCE P, DE KRETZER DM, MCLACHLAN RI. Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment:

## *Referências*

---

heterogeneous pattern of spermatogenic impairment. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1284-1291. 1998.

ZIRKIN BR, AWONIYI C, GRISWOLD MD, RUSSELL LD, SHARPE R. Is FSH required for adult spermatogenesis? *J Androl* 15:273-276. 1994.

ZHU S, QIAN Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 122:487-511. 2012.

ZLOTNIK A, YOSHIE O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127. 2000.