

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

REGULAÇÃO FUNCIONAL DOS TESTÍCULOS DE  
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTOS ATRAVÉS DO T<sub>3</sub> E IGF3

**Doutorando:**

Roberto Daltro Vidal de Souza Morais  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, ICB, UFMG.

**Orientadores:**

Prof. Dr. Luiz Renato de França  
Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas,  
Departamento de Morfologia, Laboratório de Biologia Celular,  
Belo Horizonte - MG

Prof. Dr. Rüdiger W. Schulz  
Utrecht University, Science Faculty, Department Biology,  
Research Group of Developmental Biology  
Utrecht, The Netherlands

**Belo Horizonte**

**Setembro/2013**

**ROBERTO DALTRO VIDAL DE SOUZA MORAIS**

**REGULAÇÃO FUNCIONAL DOS TESTÍCULOS DE  
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTOS ATRAVÉS DO T<sub>3</sub> E IGF3**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadores: Dr. Luiz Renato de França

Dr. Rüdiger W. Schulz

Co-orientador: Dr. Jan Bogerd

**Belo Horizonte**

**Setembro/2013**



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE**  
**ROBERTO DALTRO VIDAL DE SOUZA MORAIS**

119/2013/09  
entrada  
2º/2009  
2009749680

Às **treze horas** do dia **27 de setembro de 2013**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Regulação da função dos testículos de zebrafish (*Danio rerio*) adultos através do T3 e IGF3”** requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Luiz Renato de França**, 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. Luiz Renato de França	UFMG	APROVADO
Dr. Hugo Pereira Godinho	PUC- Minas	APROVADO
Dr. José Enemir dos Santos	PUC- Minas	APROVADO
Dra. Elizete Rizzo	UFMG	APROVADO
Dra. Erika Cristina Jorge	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, 27 de setembro de 2013.**

Dr. Luiz Renato de França (Orientador) \_\_\_\_\_

Dr. Hugo Pereira Godinho \_\_\_\_\_

Dr. José Enemir dos Santos \_\_\_\_\_

Dra. Elizete Rizzo \_\_\_\_\_

Dra. Erika Cristina Jorge \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho aos amigos e familiares  
que dividiram comigo as saudades e as  
alegrias ao longo destes quatro anos.*

*Descobri em mim uma força que  
jamais pensei um dia pudesse existir.*

## AGRADECIMENTOS

A obtenção do título de doutor não é uma tarefa que se conquista ou se celebra sozinho. Muitos foram aqueles que, envolvidos ou não com o projeto, auxiliaram-me e muito na concretização desta longa e desafiadora etapa. E é com vocês que divido a alegria desta conquista e minha gratidão por todo o apoio que recebi.

Ao Prof. Dr. **Luiz Renato de França**, pelo privilégio e honra de ser um de seus orientados. Agradeço pela excelente orientação ao longo do meu doutoramento, fruto de sua paixão e dedicação à pesquisa. Seus ensinamentos, inicialmente como seu aluno da disciplina Biologia da Reprodução e mais tarde como seu orientado, foram cruciais para meu amadurecimento profissional e não serão esquecidos! Agradeço também pela oportunidade ímpar de ter realizado o tão sonhado doutorado sanduíche na Universidade de Utrecht. Este estágio me propiciou muito mais que o já esperado crescimento profissional, ele me permitiu abrir novos horizontes, aumentar meu autoconhecimento e a vivenciar experiências que fizeram de mim uma pessoa melhor.

Ao Prof. Dr. **Rüdiger W. Schulz** (orientador na Holanda), pelo brilhantismo e pela generosidade em que compartilha com seus orientados todo o seu gigantesco conhecimento. Entre seus alunos brasileiros esta é sua marca registrada! Agradeço pela orientação exemplar e por todos os ensinamentos que recebi ao longo do meu doutoramento. É admirável ver o seu comprometimento com a pesquisa e a sabedoria com que administra as suas múltiplas funções! Agradeço também por me mostrar que na área da pesquisa, as falhas e os erros cometidos nem sempre estão diretamente relacionados com o comprometimento com a ciência. E por fim, gostaria de agradecer pela prazerosa convivência no dia-a-dia e por toda a confiança e incentivo, depositados em mim, que foram tão importantes para a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Jan Bogerd** (co-orientador na Holanda), pela grande contribuição científica e pelos ensinamentos em biologia molecular que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também pelos divertidos momentos de descontração durante o almoço, cafezinhos e por compartilhar a cultura holandesa de forma tão generosa com a intenção de nos fazer sentir cada vez mais em “casa”.

Aos técnicos **Wytse van Dijk, Joke C. M. Granneman, Herman van de Klis, Henk J. G. van de Kant, Henk C. Schriek** e **Mara Livia dos Santos**, por todo o suporte e pelas contribuições para o correto andamento dos experimentos no laboratório.

Aos alunos de mestrado que trabalharam comigo na realização de experimentos e no processamento de dados: **Maryvonne, Chris, Nuria, Inge, Mariana, Kimberly e Alicia**. Sem a motivação e o entusiasmo de vocês esta tese não seria a mesma. Muito obrigado!

Aos colegas e amigos de laboratório (brasileiro e holandês): **Profa. Gleide, Profa. Sarah, Samyra, Prof. Guilherme, Profa. Tânia, Nathália, Carolina, Rachel, Paulo, André, Thaís, Bárbara, Andréia, Fabrícia** e, em especial, **Prof. Rafael, Fernanda, Michelle, Luiz Henrique e Mariana** por todas as contribuições, ensinamentos e pelos momentos de descontração no laboratório (e fora dele) que tornam o ato de pesquisar ainda mais satisfatório!

A todos os meus familiares e em especial à minha família, meus pais, **Paulo Fernando e Sonia**, minhas irmãs, **Mayra, Fernanda e Amanda**, minha sobrinha **Luísa** e aos meus cunhados, **Renato e Iury**. Obrigado pelo incentivo e por acreditar, assim como eu, na importância deste título.

Ao **Marcelo Borghetti**, meu grande incentivador e com quem dividi as alegrias e aflições durante meu doutorado. O seu apoio foi fundamental para o sucesso desta etapa. Muito obrigado!

Aos meus amigos queridos, amigos de toda uma vida, que são e foram muito importantes para mim neste momento da minha vida. Agradeço pelo conforto nas horas difíceis e pela companhia indispensável!

A todos os colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do ICB/UFMG, em especial, **Thalita, Violeta e Paula** por todo o apoio e por estarem comigo em diversos momentos desta jornada!

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação em Biologia Celular do ICB/UFMG, por todo o suporte e pelas contribuições para a minha formação ao longo do doutorado.

E a todos aqueles que de certa forma contribuíram para a conquista deste título e que, por mero esquecimento, não foram aqui citados meus sinceros agradecimentos.

**Roberto Daltro**

Esta tese foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e na Divisão de Biologia do Desenvolvimento da Universidade de Utrecht (Holanda), sob a orientação respectivamente dos Profs. Drs. Luiz Renato de França e Rüdiger W. Schulz e com o auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)

European Union LIFE CYCLE Project

Universidade de Utrecht



## Lista de abreviaturas

**T<sub>3</sub>** = Triiodotironina

**rzf Fsh** = Hormônio folículo estimulante recombinante de zebrafish

**rzf Lh** = Hormônio luteinizante recombinante de zebrafish

**rzf Igf3** = Fator de crescimento semelhante a insulina 3 recombinante de zebrafish

**11-KT** = 11-cetotestosterona

**IHC** = Imunohistoquímica

**ISH** = Hibridização *in situ*

**SSC** = Espermatogônia-tronco

**A<sub>und</sub>** = Espermatogônia do tipo A indiferenciadas

**A<sub>diff</sub>** = Espermatogônia do tipo A diferenciadas

**wpf** = semanas pós-fertilização

**DIG** = Digoxigenina

**SCARKO** = Deleção seletiva de receptores de andrógenos em células de Sertoli

**PTM-ARKO** = Deleção seletiva de receptores de andrógenos em células peritubulares mióides

**FSHRKO** = Deleção de receptores de FSH

**GDNF** = Fator neurotífico derivado de células gliais (*glial cell line-derived neurotrophic factor*)

**GFR $\alpha$ 1** = receptor de GDNF

**Nanos2** = Fator intrínseco de células germinativas (*germ cell-intrinsic factor*)

**amh** = Hormônio anti-Mulleriano (*anti-Mullerian hormone*)

**gsdf** = Fator derivado de célula somática gonadal (*gonadal somatic cell derived factor*)

**efl $\alpha$**  = Fator de alongamento eucariótico alfa 1 (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha*)

**igf1** = Fator de crescimento semelhante a insulina 1 (*insulin-like growth factor 1a*)

**igf2a** = Fator de crescimento semelhante a insulina 2 a (*insulin-like growth factor 2a*)

**igf2b** = Fator de crescimento semelhante a insulina 2 b (*insulin-like growth factor 2b*)

**igf3** = Fator de crescimento semelhante a insulina 3 (*insulin-like growth factor 3*)

**igflra** = Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 alfa (*insulin-like growth factor 1a receptor*)

**igflrb** = Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 beta (*insulin-like growth factor 1b receptor*)

**shippo1** = Fibra densa exterior da cauda do espermatozóide 1 (*outer dense fiber of sperm tails 1*)

**sycp3l** = Proteína do complexo sinaptonêmico 3l (*synaptonemal complex protein 3*)

**fshr** = Receptor do hormônio folículo estimulante (*follicle stimulating hormone receptor*)

**lhr** = Receptor do hormônio luteinizante (*luteinizing hormone receptor*)

**pgr** = Receptor de progesterona (*progesterone receptor*)

**fgf8** = Fator de crescimento de fibroblasto 8 (*fibroblast growth factor 8*)

**cx43** = Conexina 43 (*connexin 43*)

**cx43.4** = Conexina 43.4 (*connexin 43.4*)

**ar** = Receptor de andrógeno (*androgen receptor*)

**insl3** = Fator semelhante a insulina 3 (*insulin-like 3*)

**star** = Proteína reguladora aguda esteroidogênica (*steroidogenic acute regulatory protein*)

**cyp17a1** = Citocromo P450 17 alpha 1 (*Cytochrome P450 17 alpha 1*)

**dazl** = Fator semelhante deletado na azoospermia (*deleted in azoospermia-like*)

**piwil1** = Elemento P semelhante dos testículos de Drosófila 1 (*P-element induced wimpy testis in Drosophila1*)

**piwil2** = Elemento P semelhante dos testículos de Drosófila 2 (*P-element induced wimpy testis in Drosophila2*)

**thr $\alpha$**  = Receptor de hormônio tireoidiano alpha (*thyroid hormone receptor alpha*)

**thr $\beta$**  = Receptor de hormônio tireoidiano beta (*thyroid hormone receptor beta*)

## RESUMO

A regulação da fase inicial da espermatogênese em peixes adultos é um processo que ainda não está bem estabelecido, particularmente os aspectos relacionados à proliferação das células de Sertoli e à auto-renovação ou diferenciação das espermatogônias-tronco (SSC) rumo à formação de espermatozoides. Neste contexto, investigamos no presente trabalho os eventuais efeitos diretos da triiodotironina ( $T_3$ ) nos testículos de zebrafish adultos, bem como a regulação e a atividade biológica do fator de crescimento semelhante à insulina 3 (Igf3/*igf3*). É sabido na literatura que os hormônios tireoidianos participam na regulação do crescimento e do equilíbrio do processo homeostático de vertebrados, incluindo-se o desenvolvimento e o funcionamento do sistema reprodutivo. Em nosso estudo, descrevemos efeitos inéditos do  $T_3$  na estimulação da proliferação de células de Sertoli e espermatogônias do tipo A indiferenciadas ( $A_{und}$ ) em testículos de zebrafish adultos. Estes efeitos foram sugeridos através de estudos de hibridização *in situ* (ISH), nos quais os mesmos estavam mediados através de receptores de hormônios tireoidianos localizados em células de Sertoli e Leydig. Utilizando-se de estudos *in vitro*, os efeitos do  $T_3$  na liberação de andrógenos, bem como na espermatogênese e na expressão de diversos genes de interesse selecionados foram avaliados. A liberação basal de andrógenos e a expressão de genes relacionados às células de Leydig não se alteraram em resposta ao  $T_3$ . Entretanto, na presença de Fsh, o  $T_3$  potencializou os efeitos da liberação de andrógeno estimulada pelo Fsh, bem como a expressão gênica do receptor de andrógeno (*ar*) e da enzima esteroidogênica *cyp17a1*. Além disso, de forma isolada  $T_3$  estimulou a proliferação de células de Sertoli e de espermatogônias  $A_{und}$ , propiciando assim a possibilidade de formação de novos cistos espermatogênicos. Adicionalmente, estudos de explantes testiculares demonstraram que o Igf3, um novo membro da família Igf, específico de gônadas de teleostes, mediou os efeitos do  $T_3$  na proliferação das células de Sertoli e  $A_{und}$ . Ainda, o  $T_3$  promoveu mudanças na expressão do gene conexina 43 (*cx43*), sabidamente responsivo ao  $T_3$ . Em conjunto, estes resultados sugerem que o  $T_3$  amplia a população de células de Sertoli e, como consequência a de  $A_{und}$  nos testículos de zebrafish, envolvendo a sinalização de Igf, além de potencializar a produção de andrógenos estimulada pelo Fsh e elevar a sensibilidade testicular aos andrógenos.

Em outra vertente deste trabalho, investigamos também a regulação e as eventuais funções do Igf3 nos testículos do zebrafish. É sabido que em vertebrados o sistema IGF desempenha importante papel na sobrevivência, migração, proliferação e diferenciação celulares. Assim, demonstramos que, sob a influência do Fsh, e de forma independente de andrógenos, a espermatogênese de zebrafish foi estimulada a partir da proliferação de espermatogônias do tipo A, resultando provavelmente em maior número de células germinativas haplóides. Ainda, demonstramos que o Fsh estimulou a expressão de Igf3/*igf3* nos testículos de zebrafish adultos, envolvendo a ativação dos fatores de transcrição Creb (proteína ligadora ao elemento responsivo ao AMP-cíclico) e ATF-1 (fator de transcrição dependente de AMP-cíclico), presentes na região promotora do gene *igf3*, conforme demonstrado por estudos de transfecção em células HEK 293T. Através de ISH e de imunocitoquímica, efeitos do Igf3 na proliferação espermatogonial foram sugeridos pela observação de células de Sertoli expressando Igf3 e que se encontravam envolvendo espermatogônias do tipo A. A incubação de explantes testiculares com o rzf Igf3 induziu aumento na expressão de genes relacionados com a diferenciação (*dazl*) e mitose (*pimil2*), além de estimular a proliferação de  $A_{und}$ , que foi drasticamente reduzida na presença do inibidor quinase de IGF-1R, o NVP-AEW541. Este mesmo inibidor, foi também capaz de reduzir significativamente a proliferação espermatogonial estimulada pelo Fsh, sugerindo que, mesmo sem a participação de andrógenos, via estimulação da expressão do fator de crescimento Igf3, esta gonadotrofina pode estimular a espermatogênese de zebrafish adultos. Em síntese, os resultados das duas vertentes do presente estudo fornecem importantes e inéditas informações acerca da melhor compreensão da regulação da função dos testículos de zebrafish adultos.

## ABSTRACT

The regulation of early stages of spermatogenesis in adult fish is a process that is not yet well understood, in particular the aspects related to the proliferation of Sertoli cells and self-renewal or differentiation of spermatogonial stem cells (SSC). In this context, the present study investigated the potentially direct effects of triiodothyronine ( $T_3$ ) in the testes of adult zebrafish, as well as the involvement and biological activity of the growth factor insulin-like 3 (Igf3/*igf3*) in the  $T_3$ -mediated effects. It is known in the literature that thyroid hormones participate in regulating growth and homeostatic processes in vertebrates, including development and adult functioning of the reproductive system. Here we report a new stimulatory role of thyroid hormone on the proliferation of Sertoli cells and single, type A undifferentiated spermatogonia ( $A_{und}$ ) in adult zebrafish testes. A direct role for  $T_3$  in zebrafish testis is suggested by in situ hybridization studies (ISH), which localized thyroid receptor alpha (*thra*) in Sertoli cells and the thyroid receptor beta (*thrb*) mRNA in Sertoli and Leydig cells. Using a primary zebrafish testis tissue culture system, the effect of  $T_3$  on steroid release, spermatogenesis and the expression of selected genes was evaluated. Basal steroid release and Leydig cell gene expression did not change in response to  $T_3$ . However, in the presence of follicle-stimulating hormone (Fsh),  $T_3$  potentiated gonadotropin-stimulated androgen release as well as androgen receptor (*ar*) and 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase (*cyp17a1*) gene expression. Moreover,  $T_3$  alone stimulated the proliferation of both Sertoli cells and  $A_{und}$ , potentially resulting in newly formed spermatogenic cysts. Additional tissue culture studies demonstrated that Igf3, a new, gonad-specific member of the insulin-like growth factor family, mediated the stimulatory effect of  $T_3$  on the proliferation of  $A_{und}$  and Sertoli cells. Finally,  $T_3$  induced changes in *connexin 43* mRNA levels in the testis, a known  $T_3$ -responsive gene. Taken together, our studies suggest that  $T_3$  expands the population of Sertoli cells and  $A_{und}$  involving Igf signalling, and potentiates gonadotropin-stimulated testicular androgen production as well as androgen sensitivity.

In another aspect of this work, we also investigate the regulation and the potential functions of Igf3/*igf3* in the zebrafish testis. It is known that in vertebrates the IGF system plays an important role in the cell survival, migration, proliferation and differentiation. Thus, we have shown that under the influence of Fsh, in an androgen-independent manner, stimulated zebrafish spermatogenesis to progress from the proliferation of spermatogonial of type A until the formation of haploid germ cells. In addition, we demonstrated that Fsh stimulated the expression of Igf3/*igf3* in adult zebrafish testes, involving the activation of transcription factors Creb (cAMP response element binding protein) and ATF-1 (cAMP-dependent transcription factor 1), present in the promoter region of the *igf3* gene, as demonstrated by transfection studies in HEK 293T cells. Using immunocytochemistry and ISH studies, Igf3 was localised in Sertoli cells contacting spermatogonia type A, suggesting that Igf3 effects can mainly be expected on this type of germ cells. Testicular explants incubated with rzf Igf3 increased the expression of differentiation (*da $\alpha$* ) and mitosis (*pivl2*) related genes and also stimulated the proliferation of  $A_{und}$ , which was dramatically reduced in the presence of the IGF-1R kinase inhibitor, NVP-AEW541. This inhibitor was also able to significantly reduce Fsh-stimulated spermatogonial proliferation, suggesting that even without the participation of androgens, this gonadotropin can stimulate spermatogenesis in adult zebrafish via Igf3. In summary, the results of this study provide important and novel information to better understand the regulation of testicular functions in adult zebrafish.

## SUMÁRIO

1. Introdução e revisão de literatura.....	01
2. Objetivos geral e específicos.....	09
3. Materiais e métodos.....	11
4. Resultados.....	22
5. Discussão.....	31
6. Conclusões.....	42
7. Perspectivas.....	44
8. Lista de tabela e figuras.....	47
Tabela 1.....	48
Figura I.....	49
Figura 1.....	50
Figura 2.....	51
Figura 3.....	52
Figura 4.....	54
Figura 5.....	55
Figura 6.....	56
Figura 7.....	57
Figura 8.....	58
Figura 9.....	60
Figura 10.....	62
Figura 11.....	64
Figura 12.....	66
Figura suplementar 1.....	67
Figura suplementar 2.....	68
Figura suplementar 3.....	70
Figura suplementar 4.....	71
9. Referências Bibliográficas.....	72
10. Artigo submetido.....	83

**1 – INTRODUÇÃO**  
**E**  
**REVISÃO DE LITERATURA**

### 1.1- Zebrafish como modelo experimental

Os peixes constituem cerca de 50% das ~50 mil espécies de vertebrados e exibem grande diversidade em sua biologia, morfologia e em habitats ocupados (Nelson, 1994; 2006). O sucesso dos teleósteos é atribuído a uma série de adaptações que aperfeiçoaram sua respiração, locomoção, nutrição e, principalmente, a reprodução (Moyle e Cech, 1996), caracterizada por uma das mais variadas estratégias reprodutivas (Nagahama, 1983; Redding e Patiño, 1993; Pudney 1996; Le Gac e Loir, 1999; Nakatani et al., 2001). Nesse contexto, a liberação dos gametas para fertilização externa; o desenvolvimento de órgãos especializados para fertilização interna; os variados tipos de comportamento e de cuidado com a prole; e a migração reprodutiva, seja nas formas de “piracema” ou naquelas acompanhadas por grandes alterações osmóticas, são exemplos da complexidade reprodutiva dos teleósteos (Le Gac e Loir, 1999).

Conhecer as particularidades relacionadas à biologia reprodutiva destes vertebrados é também um importante aspecto, devido, por exemplo, ao grande potencial econômico representado pela piscicultura no mercado mundial de alimentos. Além disto, algumas espécies de teleósteos são modelos biológicos experimentais bastante utilizados nas áreas de reprodução, genética e melhoramento como, por exemplo, o zebrafish (*Danio rerio*), o medaka (*Oryzias latipes*), a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Feitsma et al., 2007; Nakamura et al., 2012; Lacerda et al., 2013; Rolland et al., 2013).

O zebrafish em particular é uma espécie originária da Índia, que vive em rios, riachos e em pequenos lagos resultantes das cheias dos rios (Engeszer et al., 2007). Esta espécie apresenta diversas características que a tornam excelente modelo de estudo, podendo ser citadas, por exemplo, condições simples de manuseio, prole numerosa, fertilização externa (a qual é fácil de manipular) e fácil observação do desenvolvimento embrionário propiciada pela transparência apresentada pelos embriões (Grunwald e Eisen, 2002). Esta espécie possui vida média em torno de três anos, sua primeira maturação ocorre com 3 meses de vida e se reproduz na temperatura média de 26-28°C, por cerca de 18 meses. A fêmea deste teleósteo pode desovar cerca de 100-200 ovos semanalmente (McGonnell e Fowkes, 2006). Nos últimos anos da década de 60, esta espécie foi usada pela primeira vez como animal de laboratório pelo húngaro George Streisinger. Em 1981, este pesquisador publicou importante artigo com o título de "*Production of clones of homozygous diploid zebrafish*", na renomada revista científica *Nature*; e este foi o início do uso do zebrafish em pesquisas experimentais (Streisinger et al., 1981; Grundwald e Eisen, 2002). Em 1982, Charles Kimmel iniciou a investigação das diferentes etapas do desenvolvimento do zebrafish. Este

pesquisador também observou que os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento inicial do zebrafish eram bastante similares, por exemplo, aos de mamíferos. Em conjunto, as observações feitas para o *Danio rerio* tornaram o zebrafish um modelo adequado para estudos envolvendo o desenvolvimento de outros vertebrados (Kimmel, 1989; Kimmel et al, 1990). Assim, atualmente esta espécie é utilizada numa grande variedade de pesquisa em todo o mundo, investigações estas que podem, por exemplo, auxiliar na compreensão de doenças humanas tal como o câncer (White et al., 2013).

## **1.2- Testículo e espermatogênese em teleósteos**

À semelhança da grande maioria dos vertebrados, em teleósteos o testículo é constituído de compartimento tubular e intertubular (Schulz et al., 2010). No primeiro encontram-se, de fora para dentro, as células peritubulares mióides (com atividade contrátil), a membrana basal, o epitélio seminífero e o lume. As células de Sertoli são as únicas células somáticas no epitélio seminífero. Elas desempenham importante papel na espermatogênese e são essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento das células germinativas. Em testículos de peixes, a espermatogênese se desenvolve em estruturas denominadas de cistos, os quais são formados quando as células de Sertoli envolvem as células germinativas que se diferenciam/progridem de maneira sincrônica. Ao receberem sinais hormonais externos aos testículos as células de Sertoli produzem fatores que irão influenciar/modular a espermatogênese (Schulz et al, 2010). Dentre várias outras funções, uma propriedade importante das células de Sertoli é a sua alta atividade fagocitária, retirando do epitélio seminífero produtos/corpos residuais, bem como células germinativas em apoptose e eventuais espermatozóides que permanecem no lume tubular após a espermição (Almeida et al., 2008). O número de células de Sertoli presente nos testículos é o principal fator responsável pelo número de cistos por testículo, o que em última análise determina o tamanho deste órgão e a magnitude da produção espermática (Schulz et al., 2005; Petersen e Söder, 2006; Leal et al., 2009; Schulz et al., 2010). Pelo fato de ser considerado que as células de Sertoli de peixes não sofrem diferenciação terminal, retendo assim a sua capacidade de proliferar ao longo de sua vida reprodutiva, cada novo cisto formado em tese é composto por novas células de Sertoli (Schulz et al., 2005), as quais, à semelhança de mamíferos, parecem também proliferar sob o estímulo do FSH (Schulz et al., 2012). Classicamente, o FSH e o hormônio tireoidiano são respectivamente os principais fatores responsáveis pela proliferação e maturação/diferenciação das células de Sertoli (Orth et al., 1988; Sharpe et al., 2003; Auharek et al., 2010). Estes importantes aspectos da função das células de Sertoli serão comentados mais detalhadamente em outro tópico.



As células de Leydig encontram-se no compartimento intertubular dos testículos, geralmente em grupos próximos ou ao redor de vasos sanguíneos (Leal et al., 2009). Em teleósteos, sob estímulo tanto do Lh quanto do Fsh, estas células secretam esteróides que regulam as diferentes fases da espermatogênese (García-López et al., 2010; Schulz et al., 2010; 2012). Conforme é sabido, uma das principais funções das células de Leydig é a produção de andrógenos que através de diversas enzimas esteroidogênicas (Figura I) irão produzir testosterona (T) em mamíferos e 11-cetotestosterona (11-KT) em teleósteos. Estes andrógenos regulam a espermatogênese, incluindo-se as espermatogônias-troncos (SSC), principalmente via células de Sertoli (de Waal et al., 2009; Schulz et al., 2010).

A espermatogênese é um processo cíclico, complexo, altamente conservado e bastante coordenado, no qual a espermatogônia-tronco (SSC) pode sofrer dois tipos de divisão: i) divisão para auto-renovação, garantindo assim a fertilidade em longo prazo; e ii) divisão para prover duas células filhas, as quais formam, após número de divisões mitóticas específico para cada espécie, os espermátócitos que completarão a meiose para produzir células haplóides, os espermatozóides (Schulz et al., 2010). O balanço entre estes dois tipos de divisões é altamente coordenado. Assim, quando o mesmo é alterado rumo à auto-renovação, a formação de seminomas pode ser desencadeada. Por outro lado, se este balanço segue em direção à diferenciação, a população de SSC pode ser depletada e a espermatogênese interrompida (de Rooij e Grootegoed, 1998).

A diferenciação das células germinativas em espermatozóides pode ser dividida em três fases: i) fase mitótica, durante a qual uma série de divisões, a primeira lenta e as demais rápidas, expandem o número de células germinativas; ii) fase meiótica, na qual o material genético é duplicado, recombinado e segregado, durante as duas divisões meióticas, a última sem síntese de DNA, resultando em células haplóides; e iii) fase espermiogênica, onde as células germinativas haplóides sofrem transformações drásticas formando os espermatozóides (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994; Eddy, 1999).

Durante a fase mitótica, o número de gerações espermatogoniais pode variar bastante entre as diversas espécies de peixes (Ando et al., 2000; Schulz et al., 2010). Pelo fato da denominação das diferentes gerações de espermatogônias ser bastante variada em peixes, o uso de nomenclatura semelhante para o mesmo tipo celular tornou-se necessário. Assim, recentemente, tentativa foi feita no sentido de classificar as células germinativas de teleósteos empregando a mesma terminologia utilizada para vertebrados superiores (Schulz et al., 2010). Baseado em critérios morfológicos, as células espermatogoniais em peixes podem ser classificadas em dois tipos: tipo A e tipo B. Funcionalmente, as espermatogônias do tipo A podem ser subdivididas em espermatogônias indiferenciadas ( $A_{und}$ ), incluindo-se as SSC; e espermatogônias

diferenciadas ( $A_{diff}$ ). As espermatogônias  $A_{und}$  originam as espermatogônias  $A_{diff}$ , que compartilham algumas características morfológicas com as  $A_{und}$ . O comprometimento irreversível com a diferenciação/maturação e alterações morfofuncionais, como por exemplo, menor tamanho celular e maior quantidade de heterocromatina, resulta na formação de espermatogônias do tipo B que caracteristicamente em peixes passam por várias e rápidas divisões, propiciando considerável número de gerações deste tipo celular. Neste sentido, o melhor critério para discriminar espermatogônias do tipo B inicial do tipo B tardia baseia-se no tamanho celular/nuclear e no número de células por cisto (Schulz et al., 2005 e 2010). Merece ser ressaltado que trabalhos recentes em roedores consideram que todas as células espermatogoniais do tipo A indiferenciadas (isoladas, pareadas e alinhadas), seriam funcionalmente SSC (Yoshida et al., 2012).

### **1.3- Nicho espermatogonial e regulação da espermatogênese**

Em praticamente todos os órgãos e sistemas, a função das células tronco adultas é mantida por microambiente especializado, denominado nicho (Voog e Jones, 2010). No testículo, este microambiente é composto pelas próprias células tronco, células somáticas adjacentes e matriz extracelular (Hofmann, 2008; Nóbrega et al., 2010; Oatley e Brinster, 2012; Yoshida, 2012). Por estar em íntimo contato com as SSC, a célula de Sertoli é considerada como o principal componente do nicho espermatogonial (de Rooij e Griswold, 2012).

Na última década, diversos fatores de crescimento que são considerados importantes na regulação do nicho de SSC, ou seja, envolvidos na auto-renovação ou diferenciação destas células, têm sido descritos em roedores (de Rooij e Griswold, 2012; Oatley e Brinster, 2012). Dentre eles, podem ser citados o fator estimulador de colônia 1 (CSF1), produzido pelas células de Leydig e peritubular mióide (Oatley et al., 2009), e o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), produzido pelas células de Sertoli (Meng et al., 2000; Yomogida et al., 2003; Kokkinaki et al., 2009; Savitt et al., 2012). Evidências na literatura sugerem fortemente que o FSH regula a produção de GDNF (Tadokoro et al., 2002), que atua nas SSC através dos receptores RET (ret proto-oncogene) e GFR $\alpha$ 1 (glial cell line-derived neurotrophic family receptor alfa 1) (Buageaw et al, 2005; He et al, 2008; Hofmann, 2008; Jijiwa et al, 2008; Johnston et al, 2011). Em teleósteos, embora o nicho de SSC tenha sido ainda pouco investigado (Nóbrega et al., 2010), alguns fatores têm emergido como importantes reguladores da fisiologia da SSC, podendo ser citados, por exemplo, o hormônio anti-Mülleriano (Amh), o GFR $\alpha$ 1 (receptor do GDNF) e o Nanos2 (Skaar et al., 2011; Lacerda et al., 2013).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (Igf) também parecem desempenhar importantes funções na regulação da proliferação de células germinativas (Schulz et al., 2010). Os efeitos fisiológicos destes fatores são mediados através de receptores tirosina quinase, o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1R) (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993; Louvi et al., 1997). Em salmão-rei (*Oncorhynchus tshawytscha*) púberes, o início da proliferação espermatogonial coincide com os elevados níveis de Fsh, andrógenos e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (Igf1), fator este liberado pelo fígado sob o estímulo do hormônio do crescimento (Campbell et al., 2003). Outro importante membro da família Igf é o fator de crescimento semelhante à insulina 3 (Igf3/*igf3*). Este fator, restrito a teleósteos e expresso exclusivamente nas gônadas (Wang et al. 2008, Zou et al. 2009), tem se tornado forte candidato na regulação da fisiologia espermatogonial (Sambroni et al., 2013). No entanto, estudos envolvendo os efeitos diretos desse fator de crescimento na função testicular são ainda escassos.

Conforme já foi comentado, tanto o FSH quanto os andrógenos são considerados como os principais hormônios reguladores da espermatogênese em vertebrados. Em mamíferos, os efeitos destes hormônios na função testicular têm sido avaliados mais precisamente graças à utilização de modelos *knockouts* para receptores dos mesmos, bem como através do uso de hormônios recombinantes (Kumar et al., 1997; Dierich et al., 1998; Abel et al., 2000; De Gendt et al., 2009; O'Shaughnessy et al., 2009). Por exemplo, camundongos sem FSH ou receptor para o mesmo (FSHRKO) são férteis, mas apresentam redução significativa no peso testicular devido à redução no número de células de Sertoli e germinativas (Kumar et al., 1997; Dierich et al., 1998; Abel et al., 2000; Abel et al., 2008). Em contraste, nos camundongos com ausência de receptores de andrógenos de forma ubíqua (ARKO) ou seletiva (SCARKO; PTM-ARKO) mostraram-se inférteis (De Gendt et al., 2009; Welsh et al., 2009). Por outro lado, em abordagens experimentais nas quais camundongos deficientes de gonadotrofinas (LH e FSH) ou insensíveis ao andrógeno (ARKO e SCARKO) receberam FSH recombinante, foi observado que, embora a proliferação espermatogonial tenha ocorrido, a meiose, que é andrógeno-dependente, não se completou (O'Shaughnessy et al., 2009). No nosso conhecimento, os modelos acima citados para mamíferos não estão infelizmente disponíveis no momento para peixes. No entanto, o arranjo cístico da espermatogênese observado em peixes faz com que os mesmos se tornem atraente modelo para se investigar a função testicular.

#### **1.4- Hormônio tireoidiano e função testicular**

A relação entre hormônios tireoidianos (TH) e reprodução tem sido investigada em diferentes espécies de vertebrados (Cooke et al., 2005). Os efeitos dos TH são mediados por

membros da superfamília de receptores nucleares, os receptores de hormônios tireoidianos (THR), e à semelhança de outros vertebrados os efeitos dos TH na reprodução de peixes são também complexos (Habibi et al., 2012).

Embora não se aplique a todas as espécies investigadas (Cooke et al., 2005), em roedores (ratos, camundongos e hamsteres) a triiodotironina ( $T_3$ , o TH biologicamente mais ativo) regula o crescimento testicular e a puberdade através da estimulação da diferenciação terminal das células de Sertoli, determinando assim o período no qual estas células podem proliferar (Auharek et al., 2010; França et al., 1995; Wagner et al., 2009). Entretanto, embora em condições não fisiológicas, o estado de diferenciação das células de Sertoli de mamíferos adultos tem sido atualmente considerado mais plástico (Tarulli et al., 2012). Quanto à ação dos esteróides sexuais, a diferenciação das células de Sertoli também envolve *down-regulation* da transcrição da aromatase mediada por  $T_3$  (Catalano et al., 2003) e *up-regulation* da expressão gênica do receptor de andrógeno (*ar*; Arambepola et al., 1998). Ainda no contexto da ação dos TH na função testicular e na proliferação de células de Sertoli, Cooke e colaboradores (1991a; 1991b) demonstraram que o tamanho dos testículos e a produção espermática aumentaram notavelmente em ratos hipotireóidicos. Estes mesmos autores também demonstraram, a partir de estudos *in vitro*, que o  $T_3$  pode suprimir diretamente a proliferação e induzir a diferenciação de células de Sertoli de ratos recém-nascidos (Cooke et al., 1994). Particularmente, foi demonstrado em estudos funcionais que o TH envolve *up-regulation* de inibidores quinase dependentes de ciclina (Holsberger et al., 2005), eliminando assim os efeitos mitogênicos do FSH na proliferação das células de Sertoli (Holsberger e Cooke, 2005). Também foi demonstrado em co-cultura de células de Sertoli e gonócitos isolados de testículo de ratos recém-nascidos que o TH reduz a expressão da molécula de adesão celular neural (NCAM) (Laslett et al., 2000); e que a expressão de conexinas (CX) está relacionada com a maturação/diferenciação de células de Sertoli em mamíferos (Wagner et al., 2008).

Particularmente em relação ao TH e CX, Gilleron e colaboradores (2006) demonstraram que o  $T_3$  aumentou os níveis de CX43, a qual é uma importante proteína da junção do tipo gap que participa do controle da proliferação celular. Assim, camundongos machos com perda seletiva de CX43 em células de Sertoli apresentaram espermatogênese interrompida na fase espermatogonial ou mesmo apresentando síndrome de célula de Sertoli-*only* (Brehm et al., 2007). Em duas espécies de peixes, truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e truta-comum (*Salvelinus fontinalis*), quatro diferentes conexinas (Cxs/*cx*) foram identificadas nos testículos (de Montgolfier et al., 2007; 2009); e, uma vez que os níveis de expressão da Cx43 aumentaram

durante o início da espermatogênese, foi considerado que em trutas esta CX pode estar envolvida na maturação do testículo.

O citoesqueleto das células de Sertoli e a dinâmica dos complexos juncionais entre células Sertoli-Sertoli e entre células Sertoli-germinativa são também importantes para as funções exercidas pelas células de Sertoli (Batlouni et al., 2009; Russel et al., 1989). As junções de oclusão existentes entre as células de Sertoli fazem parte da barreira deste tipo celular (também conhecida como barreira hemato-testicular), a qual, em peixes, é formada mais tardiamente do que em mamíferos, especificamente no início da fase espermiogênica (Loir et al., 1994; Leal et al., 2009). Em machos, é sabido que as junções do tipo gap entre células de Sertoli e entre as células Sertoli-germinativas são essenciais para a espermatogênese/fertilidade (Russel et al., 1989). Pelo fato do TH modular a expressão de CX (Mendis-Handagama e Siril Ariyaratne, 2005; de Montgolfier et al., 2009), a expressão gênica das CX pode ser um importante parâmetro para estudos acerca dos efeitos do T<sub>3</sub> na cultura de testículo de zebrafish.

Através do aumento da expressão da proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), o TH também desempenha papel crítico no início da diferenciação das células de Leydig e na estimulação da esteroidogênese no período pós-natal em ratos (Mendis-Handagama e Siril Ariyaratne, 2005). Nas gônadas, efeitos estimuladores da esteroidogênese têm sido demonstrados em diferentes espécies de vertebrados, tais como ratos (Antony et al., 1995) e goldfish (Marlatt et al., 2011). Pelo menos em mamíferos, os efeitos do TH sobre a esteroidogênese podem ser diretos ou através da modulação da liberação do hormônio estimulador de gonadotrofinas (GnRH) (Antony et al., 1995).

Nos vertebrados, os THRs são expressos em diversos tipos celulares. Assim, os THs têm efeitos pleiotróficos, incluindo-se efeitos sobre as gônadas. Em goldfish, estudos recentes *in vivo* e *in vitro* sugerem que os THs afetam a síntese de esteróides, bem como a expressão de seus receptores (Habibi et al., 2012). No entanto, a maioria dos estudos experimentais desenvolvidos até o presente momento tem focado nos efeitos do TH sobre o desenvolvimento dos testículos e poucas informações encontram-se disponíveis acerca dos seus eventuais efeitos na função testicular de animais sexualmente maduros.

## **2- OBJETIVOS**

## 2- Objetivos

---

### 2.1- Objetivo Geral

Pelo fato das vias de regulação da fase inicial da espermatogênese em peixes adultos não serem ainda estabelecidas, particularmente os aspectos relacionados à proliferação das células de Sertoli e à auto-renovação ou diferenciação das SSC rumo à formação de espermatozoides, o presente estudo tem como principais objetivos avaliar os efeitos dos hormônios tireoidianos ( $T_3$ ) e folículo estimulante recombinante de zebrafish (rzf Fsh), bem como do fator de crescimento semelhante à insulina 3 recombinante de zebrafish (rzf Igf3), na função testicular de zebrafish (*Danio rerio*). As eventuais interações entre as células de Sertoli e células germinativas nos cistos espermatogênicos, particularmente naqueles mais iniciais, serão também investigadas utilizando-se de diferentes abordagens experimentais que envolvem principalmente aspectos morfofisiológicos, morfométricos e moleculares da função gonadal desta espécie de teleosteo.

### 2.2- Objetivos específicos

Com a finalidade de se investigar os efeitos dos hormônios  $T_3$ , Fsh e do fator de crescimento Igf3 nos testículos de zebrafish, os principais objetivos do presente estudo foram:

- Identificar os tipos de células testiculares que expressam receptores de hormônios tireoidianos;
- Avaliar como o  $T_3$  modula a expressão gênica de vários genes testiculares selecionados;
- Investigar se o  $T_3$ , sozinho ou em associação com o rzf Fsh, modula a esteroidogênese nos testículos de zebrafish;
- Avaliar se o  $T_3$  altera o status de proliferação de espermatogônias  $A_{und}$  e de células de Sertoli;
- Investigar os efeitos do rzf Fsh nos testículos de zebrafish, através de estudos *in vivo* e *in vitro*;
- Analisar a expressão gênica testicular em resposta às gonadotrofinas (rzf Fsh e Lh), na ausência ou presença de andrógenos;
- Identificar os sítios de expressão de  $Igf3/igf3$  nos testículos de zebrafish;
- Caracterizar a regulação da expressão do fator de crescimento  $igf3$ , através de estudos de transfecção em células da linhagem HEK 293T;
- Avaliar os efeitos do rzf Igf3 nos testículos de zebrafish, particularmente na proliferação de espermatogônias do tipo  $A_{und}$  e  $A_{diff}$ ;
- Elucidar qual seria a via de sinalização desencadeada pelo rzf Fsh na indução da espermatogênese de zebrafish, através de explantes testiculares.

**3- MATERIAIS  
E  
MÉTODOS**



### 3- Materiais e Métodos

---

#### 3.1- Metodologias aplicadas ao estudo dos efeitos da triiodotironina ( $T_3$ ) sobre os testículos de zebrafish

##### 3.1.1- Animais

Zebrafish machos (*Danio rerio*), sexualmente maduros e com 6-12 meses de idade, foram utilizados no presente estudo. Os animais foram mantidos e tratados de acordo com os regulamentos nacionais holandeses que foram aprovados pelo comitê de uso e cuidado animal da Universidade de Utrecht.

##### 3.1.2- Explantes testiculares

Para analisar os efeitos potenciais do  $T_3$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), o sistema de cultura para testículos de zebrafish foi utilizado de acordo com Leal et al. (2009). Com este propósito, vários experimentos foram conduzidos (Figura suplementar 1), incluindo-se experimentos com  $T_3$ -dose resposta (2, 10 e 50 ng/mL) para se estudar a expressão gênica e liberação de andrógeno. Para avaliação morfológica, a concentração de 50ng/mL de  $T_3$  foi selecionada. Os dois testículos de cada peixe foram incubados em paralelo, um testículo (escolhido aleatoriamente) servindo como controle para o seu contralateral. A menos que seja especificamente mencionado, oito animais foram utilizados para cada uma das diferentes condições experimentais.

##### 3.1.3- Análise morfológica

Após quatro dias de cultura, os testículos de zebrafish foram fixados em solução tamponada de glutaraldeído 4%, por 16 horas a 4° C. Em seguida, os mesmos foram desidratados, embebidos em resina plástica Technovit 7100 (HeraeusKulzer, Wehrheim, Alemanha), seccionados com 4 $\mu$ m de espessura e corados com azul de toluidina de acordo com procedimentos histológicos convencionais.

##### 3.1.4- Análise de proliferação celular

Para avaliar se o  $T_3$  afeta a atividade de proliferação das espermatogônias ou células de Sertoli, 50  $\mu$ g/mL de BrdU (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados ao meio de cultura durante as últimas 6 horas (Figura Suplementar 1). Por outro lado, com o intuito de estudar se a ação do  $T_3$  envolve a via de sinalização de fatores de crescimento semelhantes à

insulina (Igf), os testículos de zebrafish foram expostos ao  $T_3$  na ausência ou presença de  $10 \mu\text{M}$  de NVP-AEW541 (Selleckchem, Houston, Texas, EUA). Este composto é um inibidor alostérico para o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R) que impede a autofosforilação do IGF-1R, bloqueando assim a sua função tanto em camundongos quanto em zebrafish (Froment et al., 2007; Irwin et al., 2012). Após a cultura, os testículos de zebrafish foram fixados por 16 horas à  $4^\circ\text{C}$  em methacarn [(v/v) 60% de álcool absoluto, 30% de clorofórmio, e 10% de ácido acético glacial] preparado a fresco. Logo após, o material foi desidratado, incluído em Technovit 7100, seccionados com  $3 \mu\text{m}$  de espessura e submetido à imunocitoquímica (IHC) para detecção das células marcadas com BrdU, conforme descrito anteriormente por Leal e colaboradores (2009).

Com o intuito de melhor apresentar os dados e permitir análise estatística adequada, os resultados da proliferação dos experimentos apresentados nas figuras suplementares 1A e B, onde os testículos foram expostos a  $50 \text{ ng/mL}$  de  $T_3$ , foram comparados estatisticamente e, uma vez que nenhuma diferença foi encontrada, os mesmos foram agrupados para se formar um grupo único ( $n=16$ ). Este grupo assim formado foi comparado aos grupos controle e tratado com  $T_3$ +NVP.

### **3.1.5- Liberação *in vitro* de 11-cetotestosterone (11-KT) pelos testículos de zebrafish**

A capacidade de liberação de andrógeno pelo testículo de zebrafish foi medida 1 dia após cultura *ex vivo* em dois experimentos. Primeiro, os testículos de zebrafish foram incubados em meio de cultivo controle ou em meio contendo  $50 \text{ ng/mL}$  de  $T_3$  (Figura Suplementar 1A). No segundo experimento, os testículos foram expostos em meio contendo  $25 \text{ ng/mL}$  de Fsh recombinante de zebrafish (rzh Fsh) ou em meio de cultura contendo  $25 \text{ ng/mL}$  de rzh Fsh e 2, 10 ou  $50 \text{ ng/mL}$  de  $T_3$  (Figura Suplementar 1C). A liberação de 11-KT no meio de cultura foi quantificada usando bioensaio de liberação de andrógeno previamente adaptado para o testículo de zebrafish (de Waal et al., 2008). Os resultados foram expressados como nanograma (ng) de 11-KT liberados por miligrama (mg) de tecido testicular.

### **3.1.6- Análise da expressão gênica através de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)**

A capacidade do  $T_3$  (2, 10 ou  $50 \text{ ng/mL}$ ) em modular a expressão gênica testicular foi investigada 1 e 4 dias após incubação. O RNA total foi extraído das amostras usando o micro-kit RNAqueous® (Ambion, Austin, TX, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para se estimar os níveis relativos de RNAm dos genes selecionados (Tabela 1), o PCR quantitativo (qPCR) foi realizado conforme descrito por de Waal et al. (2008). Os níveis de RNAm do fator de

alongamento 1 alfa ( $ef1\alpha$ ), que permaneceram estáveis sob as diferentes condições experimentais (Figura suplementar 2), serviram como controle endógeno para os demais RNAs. Todas as reações de qPCRs foram realizadas com volume de 20  $\mu$ L de reação e os valores quantitativos dos ciclos (Cq) foram determinados utilizando-se o Sistema 7900HT de PCR em tempo real (Applied Biosystems) usando as configurações padrão. Os níveis relativos de RNA foram calculadas conforme relatado previamente (Bogerd et al. 2001; de Waal et al. 2008).

### 3.1.7- Hibridação *in situ*

Foram gerados produtos específicos por PCR para os receptores de hormônios tireoidianos, o *thra* e o *thr $\beta$* , com os primers 3691-3692 e 3695-3696 (Tabela 1), cada um contendo as sequências promotoras da RNA polimerase T3 e T7 (sublinhados) ligadas nas suas extremidades 5', respectivamente. Os produtos de PCR obtidos com ~450 e 455 pares de bases (pb) foram purificados em gel e serviram como molde para síntese de sondas de RNAc marcadas com digoxigenina (DIG), conforme descrito por Vischer e colaboradores (2003). Hibridização *in situ* (ISH) com a técnica *whole mount* foi usada para localizar RNAs de receptores de hormônios da tireóide (*thra* e *thr $\beta$* ) em testículos fixados em paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4), de acordo com métodos previamente descritos (Westerfield, 2000). O material foi tratado com proteinase K (20 $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA) a 37°C durante 20 minutos, e o anidrido acético (0,25% em 0,1 M de trietanolamina [pH 8,0]; Merck; Darmstadt, Alemanha) foi incluído para se reduzir a marcação inespecífica, pós-fixação e antes da pré-hibridização. A hibridação com T3 e T7 DIG-riboprobos foi realizada overnight a 72°C, enquanto a DIG imunocoloração foi realizada no dia seguinte utilizando anticorpos anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina (1:2000) (Roche). Após revelação com *nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate* (ambos da Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA) e 3 lavagens consecutivas com PBS, o tecido foi fixado em PFA 4% em PBS, desidratado e embebido em Technovit 8100 (HeraeusKulzer, Wehrheim, Alemanha). Secções com espessura de 7  $\mu$ m foram contrastadas com 0,1% de *Nuclear Fast Red* (em solução 5% de alumínio sulfatado) durante 2 minutos e lavadas em água corrente, durante 5 minutos. Depois de lavagem rápida em água deionizada, as secções foram secas em temperatura ambiente e montadas utilizando-se o Aqueous Mounting Medium (Dako North America Inc., CA, EUA).

### 3.1.8- Análise estatística

Para os experimentos *ex vivo* as diferenças entre os tratamentos para os parâmetros analisados (i.e. índice de incorporação de BrdU pelas células de Sertoli, níveis relativos de RNA

e quantidade de andrógenos liberada) foram testadas utilizando-se *Student's t-test* para as observações pareadas e as diferenças significativas foram indicadas por asterisco. Nas comparações feitas entre três ou mais condições (por exemplo, níveis relativos de RNAm para conexinas, índice mitótico de células de Sertoli e espermatogônias do tipo A), os dados foram analisados por ANOVA, seguidos pelo *Tukey's multiple comparison test*. Diferenças estatísticas foram indicadas por diferentes letras em minúsculo. Em determinadas situações, envolvendo por exemplo a comparação dos níveis relativos de RNAm, os dados foram transformado em logaritmo para se reduzir a variância entre os grupos. Para as análises estatísticas o software PRISM4 (GraphPad) foi utilizado e o nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Todos os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM.

### **3.2- Metodologias aplicadas para se investigar a atividade biológica e a regulação endócrina do fator de crescimento semelhante à insulina 3 (Igf3/igf3) de zebrafish**

#### **3.2.1- Animais**

Zebrafish sexualmente adultos (>90 dias pós-fertilização) do tipo selvagem, zebrafish transgênicos expressando a proteína verde fluorescente (*greenfluorescent protein*; GFP) sob o controle do promotor *vasa* específico de células germinativas (*vasa::egfp*; Krovel e Olsen, 2002) e zebrafish mutantes homozigotos para *pivill1* (*pivill1*<sup>(-/-)</sup>; Houwing et al., 2007) foram usados nos experimentos abaixo descritos. Os animais foram mantidos e tratados de acordo com os regulamentos nacionais holandeses que foram aprovados pelo comitê de uso e cuidado animal da Universidade de Utrecht.

#### **3.2.2- Efeitos biológicos do rzf Fsh na espermatogênese do zebrafish**

Os efeitos biológicos do rzf Fsh foram avaliados através do sistema de cultivo de testículo descrito anteriormente. Baseado em estudos prévios (García-López et al., 2010), a atividade do hormônio recombinante foi avaliada pela liberação de andrógeno e pela expressão testicular de genes alvos (*cyp17a1*, *star*, *igf3*, *amb*, *gsdf* e *ar*) na ausência ou presença de 500 ng/mL de rzf Fsh após 20 horas de cultivo (n = 8). Em seguida, para examinar a expressão de membros da família Igf (*igf1*, *igf2a*, *igf2b*, *igf3*) sob a influência das gonadotrofinas (rzf Fsh e Lh), os peixes receberam injeções intraperitoneais de 100 ng/g de peso corporal tanto de rzf Fsh, quanto de rzf Lh dissolvidos em PBS (volume injetado de 5-6  $\mu$ L; n = 6-8 por tratamento); o grupo controle recebeu injeções contendo PBS apenas. Duas horas após a aplicação, os peixes foram sacrificados e os testículos foram coletados para análise da expressão gênica. Ambos Fsh e Lh aumentaram os

níveis plasmáticos de 11-KT ~4 vezes quando comparado ao grupo controle (García-López et al., 2010). Para inibir a influência de andrógenos estimulada pelo Fsh e Lh sobre a expressão dos genes Igfs, 25 µg/mL de trilostano (Chemos, Regenstauf, Germany; dissolvido em DMSO, Sigma-Aldrich), um inibidor da *3β-hydroxy steroid dehydrogenase* (3βHSD), foi adicionado ao meio de cultivo. García-López e colaboradores (2010) demonstraram que 25 µg/mL de trilostano foram capazes de suprimir a liberação de andrógenos estimulada pelas gonadotrofinas. Assim, os dois testículos dos zebrafish (n = 4-8 por tratamento) foram dissecados e processados para cultivo. Um dos testículos foi cultivado em condição basal, enquanto o seu contralateral foi incubado com rzf Fsh ou rzf Lh na presença de trilostano, pelo período de 2 dias. Após o período de incubação, o RNA total dos testículos (controles e tratados) foi extraído para análise da expressão relativa dos membros da família Igf por PCR quantitativo em tempo real (García-López et al., 2010). O meio de cultura também foi coletado para confirmar se houve supressão da liberação de andrógenos estimulada pelas gonadotrofinas utilizando-se radioimunoensaio. Com o objetivo de se investigar os efeitos do Fsh independente de andrógenos na proliferação espermatogonial e na expressão gênica de genes de interesse, foram utilizados zebrafish transgênicos *vasa::egfp* (Nóbrega et al., 2011) ou zebrafish com os testículos enriquecidos com espermatogônias do tipo A, dentre elas as espermatogônias do tipo A<sub>und</sub>, em decorrência do pré-tratamento *in vivo* por 21 dias com 10 nM 17β-oestradiol (E2) (de Waal et al., 2009). Os explantes testiculares utilizando *vasa::egfp* ou pré-tratados com E2 foram desafiados em cultura da seguinte forma: um dos testículos foi incubado com 25 µg/mL de trilostano (n = 8 por tratamento e por situação genética) e o testículo contralateral incubado com 25 µg/mL trilostano + 500 ng/mL rzf Fsh (n = 8 por tratamento e por situação genética) por 7 dias. Para análise quantitativa da proliferação, 50 µg/mL de 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; Sigma-Aldrich) foram adicionados durante as últimas 6 horas de cultivo. As amostras testiculares foram coletadas para os seguintes tipos de avaliações: 1) imunodeteção de BrdU para se determinar o índice de proliferação de espermatogônias do tipo A indiferenciadas (A<sub>und</sub>) e diferenciadas (A<sub>diff</sub>) (Nóbrega et al., 2011); 2) análise da expressão gênica por qPCR; e 3) imunodeteção do GFP (Nóbrega et al., 2011) para análise qualitativa e quantitativa de espermatogônias A<sub>und</sub>. Adicionalmente, os efeitos do Fsh na espermatogênese do zebrafish foram avaliados utilizando-se suspensão de células testiculares. Assim, 9,5x10<sup>4</sup> células de um mesmo animal (n = 4 por tratamento) foram cultivadas em meio de cultura contendo 25 µl/mL trilostano (controle), 11-KT (4x10<sup>-7</sup>M) ou com Fsh+trilostano (100 e 25 ng/mL respectivamente) por 7 dias. As células foram coletadas e processadas para marcação com iodo de propídio (PI) com o intuito de se quantificar o DNA de acordo com estudos prévios (Saito et al., 2011), utilizando-se citometria de fluxo, onde a proporção de células haplóides

(espermátides/espermatozóides) foi avaliada por histogramas de DNA para cada condição experimental investigada (controle, 11-KT e Fsh).

### **3.2.3- Localização testicular da expressão de Igf3 por hibridização *in situ*, imunohistoquímica e *Western Blot***

Com o objetivo de se determinar se os sítios de expressão dos peptídeos de Igf estão no compartimento somático ou germinativo do testículo, os níveis relativos de RNAm dos membros da família Igf (*igf1*, *igf2a*, *igf2b* e *igf3*) foram comparados entre zebrafish do tipo selvagem e zebrafish mutantes *piv11<sup>(-/-)</sup>* (sem células germinativas; n = 3 peixes por situação genética; Houwing *et al.* 2007). Para visualizar os sítios de expressão testicular de RNAm de *igf3*, ISH foi realizada utilizando-se *whole mounts*. Desta forma, duas horas após as injeções de rzf Fsh (100 ng/g de peso corporal), com o objetivo de se elevar os níveis de RNAm de *igf3*, testículos de zebrafish foram utilizados. Para sintetizar as sondas de RNAc marcadas com digoxigenina (DIG), produtos específicos por PCR para *igf3* foram gerados. Os produtos assim obtidos com ~572 pares de base (pb) foram gerados com primers específicos contendo as sequências promotoras da RNA polimerase T3 e T7 (sublinhados) ligadas nas suas extremidades 5'-, respectivamente, conforme descrito por Vischer e colaboradores (2003). A técnica de ISH foi realizada de acordo com a metodologia descrita anteriormente (veja sessão 3.1.7). Objetivando localizar Igf3, em nível protéico, os domínios B e E de Igf3 de zebrafish foram selecionados para a produção de anticorpos policlonais. A especificidade dos anticorpos foi confirmada por *Western Blot* e IHC. Na análise por *Western Blot*, as proteínas testiculares foram separadas em gel SDS-PAGE, transferidas em membranas PVDF, imunotransferidas com anticorpos primários contra os domínios B e E da Igf3, e as bandas das proteínas foram visualizadas de acordo com procedimentos de rotina descritos por Houwing *et al.* (2007). Já nas reações de IHC, testículos fixados com PFA 4% (PBS; pH 7,4) foram bloqueados contra peroxidase endógena e marcação inespecífica com soro normal de cabra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em PBS, previamente a incubação *overnight* com o antissoro (contra os domínios B e E) ou com o soro pré-imune ou peptídeos de bloqueio. Esta reação de IHC foi realizada com diaminobenzidina tetrahidrocloro/peróxido de hidrogênio (DAB) e os cortes histológicos do testículo foram contra-corados com hematoxilina conforme descrito anteriormente (Nóbrega *et al.*, 2011). Os efeitos do Fsh sobre os níveis de Igf3 testicular foram induzidos através de injeções de rzf Fsh (n = 8), enquanto os peixes controles (n = 8) receberam injeções de PBS e coletados após 8 horas para ICH. Para confirmar a atividade biológica do rzf Fsh, os níveis plasmáticos de 11-KT foram avaliados através de radioimunoensaio, conforme descrito por García-López e colaboradores (2010).

### 3.2.4- Atividade biológica da proteína recombinante Igf3 (*rzf Igf3*) na espermatogênese de zebrafish

Para estudos em cultura de tecidos, a expressão gênica e a morfologia testicular foram os parâmetros utilizados para se definir a concentração ideal do peptídeo recombinante. Assim, explantes testiculares foram realizados em zebrafish pré-tratados com E2 (de Waal et al., 2009), na ausência ou presença de *rzf Igf3*, nas concentrações de 10, 100 ou 1000 ng/mL, durante 7 dias e o meio de cultura foi substituído uma vez no terceiro dia. Após este procedimento, os testículos foram coletados para análises histológicas e qPCR em tempo real. Com o objetivo de se avaliar a influência da *rzf Igf3* na liberação de andrógenos basal ou estimulada pelo Fsh, testículos de zebrafish (n = 8) foram incubados com 100 ng/mL de *rzf Igf3* na ausência ou presença de *rzf Fsh* (25 ng/mL). Estes testículos foram submersos em 200 µL de meio em placa de 96 poços (Corning, New York, NY, EUA), por 16 horas. Após incubação, os testículos foram pesados e o meio de cultura foi coletado e processado para quantificação da liberação de andrógeno por radioimunoensaio previamente adaptado para o testículo de zebrafish (de Waal et al., 2008). Os resultados obtidos foram apresentados como nanograma (ng) de 11-KT liberados por miligrama (mg) de testículo. No intuito de se verificar a atividade biológica *in vivo* da *rzf Igf3*, foram injetados 2 µg/g de peso corporal (conforme Chen et al., 2000) na cavidade peritoneal do zebrafish (n = 5), enquanto PBS foi injetado no grupo controle (n = 5). Duas horas após estes procedimentos, os testículos foram coletados e processados para qPCR em tempo real, utilizando-se primers específicos (Tabela 1).

### 3.2.5- Análise da região promotora putativa do gene *igf3* de zebrafish e regulação *in vitro* da expressão do *igf3* através de transfecção celular

A sequência putativa da região promotora englobando toda a região não codificadora *upstream* (2.0 kb) do gene *igf3* de três diferentes espécies de peixes foram obtidas utilizando-se o banco de dados Ensembl ([www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)). Após alinhamento das três diferentes sequências obtidas utilizando-se o software Muscle ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/)), os sítios de ligação de possíveis fatores de transcrição responsáveis pelo controle transcricional da expressão do *igf3* foram identificados através do software TESS ([www.cbil.upenn.edu/tess](http://www.cbil.upenn.edu/tess)). Baseado na sequência da região promotora, diferentes produtos (*constructs*) foram gerados utilizando-se *pool* de DNA de zebrafish que foi amplificado por PCR. Deleções na região promotora (até 1.0 kb), ou mutações pontuais nos sítios de ligação de fatores de transcrição selecionados, foram introduzidas na sequência da região promotora utilizando-se o kit

QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Os *constructs* foram subclonados em vetores básicos pGL3, contendo o gene repórter da luciferase (Promega, Leiden, Holanda) segundo as recomendações do fabricante. Um total de 16 *constructs* foram gerados e todos eles foram confirmados por sequenciamento.

Para os estudos de transfecção específicos, células embrionárias humanas de rins (HEK 293T) foram utilizadas. Estas células foram mantidas em câmara úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e cultivadas com DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), suplementado com solução antibiótica (100 IU/mL), 2mM glutamina e 10% de soro fetal bovino (FBS). Todos estes reagentes utilizados foram da Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Um dia anterior a transfecção,  $\sim 15 \times 10^4$  células foram transferidas para placas de 24 poços (Corning, New York, NY, EUA). Estas células foram transitoriamente co-transfectadas por polietilenimina com o total de 850 ng de DNA plasmidial, sendo 500 ng *constructs* por deleção/mutação, 100 ng TK-Renilla plasmídeo como controle interno e 250 ng vetor pcDNA3 (vazio) para se atingir a quantidade de DNA plasmidial necessária. Para cada *construct*, a transfecção foi feita em triplicatas. Vinte e quatro horas após a transfecção, o meio de cultura foi apropriadamente trocado por meio basal/controle ou contendo 10  $\mu$ M de forskolina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), que sabidamente eleva os níveis de AMP-cíclico (cAMP), através da proteína A (PKA). Após 8 horas do estímulo empregado, as células foram lavadas com PBS (Dubecco's PBS, H15-002) e lisadas com 200  $\mu$ L de tampão de lise passivo (Promega, Dual-Luciferase® Reporter Assay System; Madison, WI, EUA). Vinte e cinco  $\mu$ L de lisado foram usados para medir a atividade da luciferase (firefly) e do TK-renilla utilizando-se o Centro XS<sup>3</sup> LB 960 Microplate Luminometer (Berthold Technologies GmbH e Co; Vilvoorde; BE). Os resultados foram expressos como a razão entre firefly e TK-renilla. Objetivando confirmar a dependência da expressão de *igf3* via cAMP, testículos de zebrafish foram expostos a rzf Fsh 500 ng/mL, na presença ou ausência de inibidores da via do cAMP. Neste sentido, foram utilizados o inibidor da PKA (H89; 100  $\mu$ M) e da MAPK (PD98059; 50  $\mu$ M), durante 7 dias.

### **3.2.6- Localização dos receptores de Igf e efeitos da rzf Igf3 na proliferação espermatogonial**

Com o intuito de se identificar os tipos celulares que expressam os receptores de Igf (Igf1ra e Igf1rb), células de testículos (n = 2-4) de zebrafish transgênicos *vasa::egfp* foram utilizadas. Estas células foram submetidas ao FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) usando o *Flux cell sorter* (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) para separar células positivas Egfp (principalmente células germinativas) das células negativas (células somáticas), conforme descrito previamente por



Hinfray e colaboradores (2013). Ainda, para diminuir a contaminação das células germinativas com células somáticas, uma terceira fração celular foi obtida após seleção de células Egfp positivas submetidas ao plaqueamento diferencial (Hinfray et al., 2013). O RNAm total de células Egfp positivas, negativas e de células positivas, obtidas após plaqueamento diferencial, foi extraído e a expressão relativa dos receptores de Igf foi comparada com os valores relativos de genes específicos de células de Sertoli (*gsdf*), células de Leydig (*star*) e células germinativas (*pimil2*), em cada uma das frações avaliadas. Foram comparados ainda os níveis de expressão de *igf3* e receptores Igf com os níveis de expressão de *dazl* (marcador de diferenciação de células germinativas) e *scp3l* (marcador de meiose) (Houwing et al., 2008; Chen et al., 2013).

Com a finalidade de se avaliar o padrão de expressão de genes durante a ontogênese das gônadas de zebrafish, os níveis relativos de RNAm de vários genes alvo (*igf3*, *igf1ra*, *igf1rb*, *dazl*, e *scp3l*) foram quantificados e comparados entre machos e fêmeas, de acordo com Skaar e colaboradores (2011). Neste sentido, amostras (n = 6-8) foram coletadas nas seguintes idades consideradas críticas para o nosso estudo: 4 semanas pós-fertilização (wpf), quando ocorre o término da diferenciação sexual; 8 wpf, fase puberal na qual as gônadas mostram crescimento contínuo; e 12 wpf onde os zebrafish são considerados adultos jovens.

Já nos estudos envolvendo proliferação celular ( $A_{und}$ ), explantes testiculares de peixes pré-tratados com E2 foram realizados. Assim, um dos testículos foi tratado com 100 ng/mL de rzf Igf3, enquanto o testículo contralateral foi incubado com meio de cultura basal/controle. Adicionalmente, culturas testiculares para se avaliar a proliferação espermatogonial induzida pelo Igf3 ou Fsh, na presença do inibidor específico de IGF-1R, o NVP-AEW541 (10  $\mu$ M; Irwin et al., 2012), foram realizadas. Mais detalhadamente, dois experimentos foram desenvolvidos: 1) explantes expostos a 100 ng/mL de rzf Igf3, na ausência ou presença de 10  $\mu$ M de NVP-AEW541 (n = 8); e 2) explantes que receberam 100 ng/mL de rzf Fsh, na ausência ou presença de 10  $\mu$ M de NVP-AEW541 (n = 8). Em todos os experimentos, 50  $\mu$ g/mL de BrdU (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados ao meio de cultura nas últimas 6 horas de cultivo e o índice de proliferação foi determinado de acordo com Leal e colaboradores (2009).

### 3.2.7- Análise estatística

Diferenças estatísticas entre os diversos grupos experimentais investigados foram detectadas utilizando-se *Student's t test* (pareado e não pareado). Para comparações entre dois ou mais grupos foi utilizado *one-way ANOVA* seguido por *Student-Newman-Keuls test*. Os resultados referentes ao rt-qPCR dos experimentos de *cell sorting* foram avaliados através de *one-way ANOVA* seguido pelo *Dunnnett's multiple comparison test*, no qual as células Egfp positivas serviram como

grupo de referência. Para as análises estatísticas o software PRISM4 (GraphPad) foi utilizado e o nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Todos os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM.

## **4- RESULTADOS**

## 4- Resultados

---

### 4.1- Efeitos da triiodotironina ( $T_3$ ) sobre os testículos de zebrafish

#### 4.1.1- *Localização do RNAm dos receptores de hormônios tireoidianos nos testículos de zebrafish*

A identificação dos tipos celulares que expressam os RNAs para os dois THR descritos para zebrafish (*thra* e *thrβ*) foi realizada por ISH. Com base nas suas morfologia e localização, as células marcadas nos compartimentos tubulares e intertubulares foram identificadas como células de Sertoli e de Leydig (Figura 1). A marcação para RNAm do *thra* foi detectado apenas em células de Sertoli (Figura 1A) e estas células marcadas encontravam-se em contato com células germinativas nos diferentes estágios de diferenciação (Figura 1B). Já a marcação para RNAm do *thrβ* foi observada tanto em células de Sertoli quanto de Leydig (Figura 1C e D). Para ambos os receptores marcação foi também encontrada nos cistos espermatogênico como finas projeções entre as células germinativas, conforme ilustrado em cistos contendo espermátócitos (Figura 1B) ou espermátides (Figura 1D). Nenhum sinal específico foi obtido quando as secções foram incubadas com as sondas senso para *thra* e *thrβ* (em detalhes na Figura 1B e D).

#### 4.1.2- *Efeitos da triiodotironina ( $T_3$ ) na expressão gênica e liberação de andrógeno*

Com a finalidade de investigar se o  $T_3$  altera a expressão gênica testicular, os níveis de RNAm dos genes selecionados (Tabela 1) para as células de Sertoli, de Leydig e germinativas foram quantificados. No primeiro experimento usando 50 ng/mL de  $T_3$ , apenas os níveis de RNAm do fator de crescimento semelhante à insulina 3 (*igf3*), um subtipo de Igf específico de gônadas recentemente descrito em peixes teleósteos (Wang et al., 2008), apresentou alteração significativa com 1 dia de cultivo (Figura 2A). Em novas análises usando diferentes doses de  $T_3$ , verificou-se que os níveis de RNAm de *igf3* foram *up-regulated* com 1 dia de cultivo, em resposta às doses intermediária e mais elevada de  $T_3$ , ou seja, 10 e 50 ng/mL respectivamente (Figura 2C). Nenhuma resposta foi observada com 4 dias de incubação, quando 50 ng/mL de  $T_3$  foi utilizado (Figura 2B). Investigando-se os efeitos do  $T_3$  nos níveis de RNAm para as duas conexinas investigadas, *down-regulation* transitória nos níveis de RNAm da *cx43* foi observada com um dia de cultivo (Figura 2D), a qual foi revertida nos testículos cultivados por 4 dias. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de RNAm da *cx43.3*, em resposta ao  $T_3$ .

A liberação de 11-KT no meio de cultura (Figura Suplementar 1A e C) foi quantificada após 1 dia de cultivo. Conforme se observa na Figura 3, a exposição ao  $T_3$  não alterou os níveis

basais da liberação de 11-KT. Entretanto, em experimentos envolvendo  $T_3$ -dose resposta, em combinação com rzf Fsh, demonstrou que com a dose mais elevada (50 ng/mL de  $T_3$ ) a liberação de 11-KT apresentou-se significativamente aumentada quando comparada com os valores obtidos apenas com rzf Fsh, o qual por sua vez estimulou a liberação deste andrógeno acima dos níveis obtidos em condições basais ou somente na presença de  $T_3$ . Além disso, em comparação com os testículos incubados em condições basais, a expressão gênica de *ar* e *cyp17a1* não mostrou variação nos testículos cultivados por 1 dia expostos somente ao  $T_3$  (Figura 3B). Entretanto, em combinação com o Fsh, a dose mais elevada de  $T_3$  aumentou significativamente a expressão destes dois genes (Figura 3B). Resultados anteriores (García-López et al., 2010) mostraram que o rzf Fsh isoladamente não foi capaz de alterar os níveis de RNAm para *ar*, acarretando no entanto aumento de 4 vezes nos níveis de RNAm para *cyp17a1*. Estes resultados sugerem que o  $T_3$  desempenha papel permissivo para os efeitos estimulatórios do Fsh na produção de andrógeno, bem como na sensibilização androgênica dos testículos de zebrafish adultos.

#### **4.1.3- Triiodotironina estimula a proliferação de células germinativas e de Sertoli**

A análise morfológica demonstrou que a cito-arquitetura dos testículos permaneceu intacta tanto naqueles cultivados sob condições basais quanto nos que foram incubados na presença de  $T_3$ . Assim, nestes testículos, o processo espermato gênico apresentava-se aparentemente normal e cistos com células germinativas em todos os estágios de diferenciação, incluindo espermatozóides livres no lume dos túbulos seminíferos (Figura 4A e B), foram observados. Em comparação com os testículos do grupo controle (basal), a investigação dos efeitos do  $T_3$  na espermatogênese após 4 dias de cultura (Figura 4C) mostrou um percentual maior ( $p < 0,05$ ) de cistos de espermatogônias  $A_{und}$ , em contraposição com menor percentual ( $p < 0,05$ ) de cistos contendo espermátides.

Com a finalidade de determinar se o  $T_3$  também alteraria a atividade proliferativa das células germinativas mais iniciais e das células somáticas do epitélio seminífero, o índice mitótico foi obtido utilizando-se o BrdU como marcador. Assim, a avaliação quantitativa dos cortes histológicos através de imunocitoquímica mostrou índice significativamente mais elevado de espermatogônias  $A_{und}$  positivas nos testículos de zebrafish tratados com  $T_3$  (Figura 5), sugerindo que a proliferação deste tipo celular seria responsável pelo maior percentual destas células germinativas observado na análise morfométrica (Figura 4C). Proliferação de células de Sertoli foi também observada (Figura 6A). Desta forma, a avaliação do índice mitótico destas células somáticas demonstrou que após tratamento com  $T_3$  ~30% das mesmas foram BrdU positivas, comparado com apenas ~9% do valor observado no grupo controle (Figura 6B). células de

Sertoli BrdU-positivas foram detectadas tanto em associação com células germinativas formando cistos espermatogênicos quanto como células de Sertoli 'livres' (i.e. não associadas com células germinativas) que representavam grande parte das células marcadas. Enquanto aquelas presentes nos cistos espermatogênicos encontravam-se predominantemente associadas com espermatogônias dos tipos A e B e, em menor grau, com espermátides e espermátócitos (Figura 6C).

Membros da família Igf são conhecidos por sua atividade mitogênica. No presente estudo, conforme mostrado na Figura 2A e C, foi observado que o  $T_3$  induziu aumento dos níveis testiculares de RNAm de *igf3*. Neste sentido, foi avaliado se a proliferação de espermatogônias  $A_{und}$  e de células de Sertoli estimulada pelo  $T_3$  depende da via de sinalização mediada pelos receptores de Igf. Os resultados encontrados mostraram que nos testículos incubados com  $T_3$ , na ausência ou presença do inibidor (NVP-AEW541) de receptor de Igfs (Figura Suplementar 1B), a incorporação de BrdU induzida pelo  $T_3$  em  $A_{und}$  (Figura 5) e células de Sertoli (Figura 6) foi respectivamente abolida ou mesmo reduzida, levando a diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no índice mitótico destes dois importantes tipos celulares.

## **4.2- Atividade biológica e regulação endócrina do fator de crescimento semelhante à insulina 3 (Igf3/ *igf3*)**

### **4.2.1- Fsh ativa a espermatogênese em zebrafish de maneira independente de andrógenos**

Para avaliar se a espermatogênese é iniciada apenas pelo Fsh ou por andrógenos, rzf Fsh foi sintetizado (García-López et al., 2010) e testado no sistema de cultura desenvolvido especificamente para testículos de zebrafish (Leal et al., 2009). No presente tópico iremos avaliar a regulação da espermatogênese em zebrafish através das gonadotrofinas e andrógenos, utilizando-se de técnicas moleculares e histomorfométricas aplicadas ao testículo.

Numa primeira abordagem, conforme ocorre em peixes, a atividade biológica do rzf Fsh foi confirmada pela capacidade do mesmo em estimular a produção de andrógenos, e pelo perfil de expressão de alguns genes de interesse que foram selecionados, após 20 horas de cultura testicular (Figura 7A). À semelhança de resultados anteriores já encontrados em nosso laboratório (García-López et al., 2010), rzf Fsh foi capaz de aumentar os níveis de transcrição de genes relacionados a esteroidogênese, tais como *cyp17a1* e *star*, e suprimir a expressão do *amb* (Figura 7A), que é membro da família TGF-beta (Skaar et al., 2011). Para testar a hipótese de que o Fsh e/ou Lh poderiam desencadear a espermatogênese via produção de fatores de crescimento de membros da família Igf, os níveis de RNAm dos mesmos foram quantificados (Figura 7B-D). O

rzf Fsh induziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a transcrição dos genes *igf1*, *igf2a*, *igf2b*, *igf3* *in vivo*, duas horas após injeção (Figura 7B), e *ex vivo* vinte horas após incubação dos testículos (Figura 7C). Em contraste com o estímulo induzido pelo rzf Lh, entre os membros da família Igf, o gene *igf3* foi o mais estimulado ( $\sim 20$  vezes *in vivo*;  $\sim 8$  vezes *in vitro*) pelo rzf Fsh (Figura 7B-D). Assim, o trilostano, um inibidor alostérico da  $3\beta$ -Hsd, foi adicionado ao meio de cultura com o intuito de verificar se a expressão dos genes membros da família Igf selecionados seria induzida somente pelo Fsh. Os resultados encontrados demonstraram que a expressão do *igf3*, em particular, é regulada exclusivamente pelo Fsh (Figura 7C-D).

A etapa seguinte foi verificar os efeitos diretos do rzf Fsh no testículo, particularmente na espermatogênese de zebrafish *vasa::egfp* e selvagens. Neste sentido, foram utilizados peixes com espermatogênese depletada através da exposição *in vivo* a 10 nM de estradiol por 21 dias, abordagem esta que induz, via feedback negativo do eixo H-H-T, insuficiência de andrógenos (de Waal et al., 2009). Após 7 dias de cultivo, foi observado nos explantes testiculares que o rzf Fsh - em combinação com o trilostano, ou seja na ausência de andrógenos - pode estimular a espermatogênese de zebrafish pelo aumento do número de espermatogônias  $A_{und}$  *vasa::egfp* positivas (Figura 8A-C), bem como em  $\sim 2$  vezes a incorporação de BrdU pelas espermatogônias do tipo A ( $A_{und}$  e  $A_{diff}$ ; Figura 8D-F). Em relação ao grupo controle (trilostano sozinho), a análise por citometria de fluxo mostrou ainda aumento relativo de células haplóides nas suspensões celulares obtidas dos explantes tratados com rzf Fsh + trilostano (Figura 8G). Analisando a expressão de alguns genes testiculares selecionados nos peixes com a espermatogênese depletada, a expressão de *igf3* induzida pelo Fsh mostrou-se drasticamente aumentada ( $\sim 90$  vezes sobre o grupo controle), sugerindo fortemente que, ao invés de sua conhecida função na liberação de andrógenos, o Fsh foi capaz de reativar a espermatogênese em zebrafish, via produção de Igf3, (Figura 8H).

### **5.2.2- *Igf3* é expresso em células de Sertoli presentes nos cistos de espermatogônias do tipo A**

Neste tópico, testículos de zebrafish mutantes *pivill1*<sup>(-/-)</sup> com a espermatogênese depletada (Houwing et al., 2007) foram utilizados para se investigar os níveis de expressão de RNAm para Igf3, e os valores encontrados para estes peixes foram comparados com àqueles de zebrafish selvagem. O fato dos níveis de expressão de Igf3 não ter mostrado alteração significativa ( $p > 0,05$ ) entre as duas linhagens de zebrafish investigadas (Figura 9A) sugeriu que o Igf3 poderia ser expresso nas células somáticas do testículo, principalmente células de Sertoli e de Leydig ou mesmo células peritubulares mióides. Assim, com a finalidade de se investigar quais tipos de

células somáticas expressam Igf3, a técnica de ISH foi utilizada e rzf Fsh foi injetado na cavidade peritoneal, para aumentar os níveis de detecção de RNAm de Igf3, e os testículos foram coletados 2 horas após a injeção. Conforme já foi demonstrado anteriormente, a expressão de Igf3 foi amplamente aumentada (~20 vezes) nos testículos após injeção com rzf Fsh. Utilizando-se desta estratégia, a expressão de Igf3 foi detectada em células de Sertoli presentes em cistos espermatogênicos iniciais, particularmente naqueles contendo espermatogônias do tipo A (Figura 9B-C). Vale ser ressaltado que nenhuma marcação específica foi detectada com a sonda senso (Figura 9D).

Em outros experimentos, dois anticorpos contra os domínios B e E de Igf3 foram produzidos para demonstrar, em nível protéico, a localização de Igf3 nos testículos. Através de Western Blot e imunocitoquímica foi demonstrado que o anticorpo contra o domínio B foi inespecífico (dado não mostrado). Já o anticorpo contra o domínio E foi específico (~17KDa; Figura 9E) e a imunodeteção do mesmo foi observada exclusivamente em células de Sertoli que estavam envolvendo espermatogônias do tipo A (Figura 9F-G). Assim, nenhuma detecção foi encontrada em células de Leydig ou em células de Sertoli envolvendo células germinativas em fases mais avançadas. A imunodeteção do Igf3 foi também realizada em testículos de zebrafish coletados 8 horas após injeção de rzf Fsh. Em comparação com os animais controle, a injeção com Fsh aumentou cerca de três vezes os níveis plasmáticos de 11-KT (Figura 9H) e aparentemente mais células de Sertoli expressando Igf3 foram recrutadas, as quais, uma vez mais, estavam associadas com espermatogônias do tipo A (Figura 9I-L). Estes resultados sugerem fortemente que o Fsh estimula tanto os níveis de RNAm quanto os níveis protéicos de Igf3 em células de Sertoli envolvendo cistos espermatogênicos mais iniciais.

### **5.2.3- CRE e ATF-1 estão envolvidos na regulação da expressão do gene *igf3***

Com a finalidade de se identificar quais fatores de transcrição poderiam estar envolvidos na regulação da expressão de *igf3*, análise *in silico* da região promotora do gene *igf3* foi realizada em zebrafish (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*) e stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) para se detectar motivos conservados entre eles. Neste contexto, o alinhamento das três seqüências promotoras (Figura Suplementar 3) revelou dois motivos conservados; o elemento responsivo ao AMP-cíclico (CRE) e fator de transcrição dependente de AMP-cíclico 1 (ATF-1). Utilizando-se destas informações, duas seqüências da região promotora foram identificadas no genoma do zebrafish. Estas duas seqüências, bem como a relevância biológica de CRE e ATF-1, foram investigadas através de transfecção em células HEK 293T com as versões das seqüências promotoras selvagens, truncadas e mutantes (Figura 10A e B). Em ambas as seqüências analisadas a atividade



da luciferase foi reduzida nas versões truncadas, sugerindo que informações removidas nestas versões podem ser relevantes para desencadear/ativar a expressão de *igf3*. Ainda, quando CRE e ATF-1 foram mutados, isoladamente ou em combinação, a atividade da luciferase apresentou-se substancialmente reduzida ( $p < 0,05$ ), indicando que a expressão de *igf3* é provavelmente regulada através destes motivos (Figura 10C-F). Dando continuidade a investigação desta via, funcionalmente, testículos de zebrafish foram incubados com rzf Fsh, na ausência ou presença de inibidores da via do cAMP. A análise da expressão gênica revelou que, na presença dos inibidores, os níveis de expressão de *igf3* induzidos pelo Fsh foram significativamente ( $p < 0,05$ ) reduzidos (Figura 10G). Em conjunto, nossos resultados indicam que a expressão de *igf3* é regulada/dependente da via de sinalização do cAMP e MAPK.

#### **5.2.4- rzf Igf3 estimula a espermatogênese de zebrafish através do aumento de genes envolvidos na diferenciação de células germinativas**

Com o objetivo de verificar a concentração ideal de rzf Igf3, cultura de testículos pré-tratados *in vivo* com E2 (de Waal et al., 2009) foi realizada e os mesmos foram incubados por 7 dias com diferentes doses de rzf Igf3. Conforme mostrado pela análise da expressão gênica, estimulação evidente de alguns genes de interesse foi observada somente com 100 ng/mL de rzf Igf3 (Figura 11A). Particularmente, nesta dose a expressão dos genes envolvidos na diferenciação das células germinativas e que são fundamentais para a mitose, tais como *pimil2* (*zili*; Houwing et al., 2008) e *dazl* (Reynolds et al., 2007; Chen et al., 2013) apresentaram-se respectivamente ~2 e ~4 vezes aumentada. Nenhuma alteração significativa ( $p > 0,05$ ) foi observada na expressão de genes (*amb*, *gsdf*, *pgr*, *fgf8*, *fshr*, *lbr* e *ar*) relacionados às células somáticas testiculares (Figura 10B). A avaliação morfológica mostrou que esta dose foi também bastante efetiva na estimulação da espermatogênese (Figura 11C-F).

Em abordagem, a Figura 11G mostra que injeções *in vivo* de rzf Igf3 não alteraram o padrão de expressão gênica de células somáticas testiculares de zebrafish (i.e. células de Sertoli e células de Leydig), quando comparado com os peixes não tratados. Este achado foi semelhante ao estudo realizado *in vitro*, sugerindo que efeitos de rzf Igf3 podem ocorrer diretamente sobre as células germinativas. Para excluir a possibilidade de que o Igf3 estimularia a liberação de andrógenos, foi avaliado por radioimunoensaio os efeitos de rzf Igf3 isoladamente, ou em associação com rzf Fsh, na liberação basal de 11-KT. Conforme se observa na Figura 11H, tanto nos níveis basais quanto na liberação estimulada pelo Fsh nos testículos de zebrafish, foi verificado que rzf Igf3 não exerce influência na liberação de andrógenos. Desta forma, fica

evidente que a estimulação da espermatogênese do zebrafish pelo rzf Igf3 ocorre através de efeito direto deste fator de crescimento.

### **5.2.5- Os efeitos do Igf3 na progressão da espermatogênese podem ser mediados pelo Igf1rb**

A partir dos resultados indicando que as células germinativas são alvos diretos de Igf3, os tipos celulares somáticos e germinativos que poderiam eventualmente expressar receptores de Igf (Igf1ra e Igf1rb) foram investigados em suspensões celulares de testículos de zebrafish *vasa::egfp*, utilizando-se *cell sorting* (Hinfray et al., 2013). Assim, foi observado que neste ensaio experimental células germinativas gfp positivas expressavam ambos os receptores investigados (Figura 12A). No entanto, a presença do gene *gsdf* sugeriu que células de Sertoli estavam presentes neste *pool* de células germinativas gfp positivas. Já em outro ensaio, no qual o plaqueamento diferencial foi utilizado, verificou-se que, embora não apresentando significância estatística, a expressão de *igf1ra* diminuiu consideravelmente, enquanto a expressão de *igf1rb* permaneceu inalterada (Figura 12A). Em comparação com o *igf1ra*, estes resultados sugerem que a expressão de *igf1rb* está presente predominantemente nas células germinativas.

Com a finalidade de se elucidar se o Igf3 pode exercer suas ações nas células germinativas principalmente através do Igf1rb, a expressão de *igf3* bem como dos receptores de Igf foi analisada durante o desenvolvimento gonadal (testículos e ovários). A associação da expressão destes genes com os níveis de RNAm de genes sabidamente envolvidos na diferenciação (*dazl*) e na meiose (*yyp3l*) das células germinativas, foi investigada. Os resultados mostraram que o *igf3* é expresso já no início do desenvolvimento gonadal (4 wpf) e que esta expressão apresentou aumento significativo quando a diferenciação sexual é completada e a o desenvolvimento puberal é iniciado (8 wpf) (Figura 12D). Neste período (8 wpf), foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na expressão de *igf3* entre zebrafish machos e fêmeas, o que pode estar correlacionado com a entrada massiva das células germinativas em meiose nos testículos, demonstrada pela alta expressão de *yyp3l*. De maneira geral, ao longo da ontogênese gonadal, o padrão de expressão do *igf1rb* foi semelhante ao observado para *igf3*, enquanto o *igf1ra* teve a sua expressão significativamente mais elevada ( $p < 0,05$ ) apenas durante o estágio mais avançado do desenvolvimento gonadal (12 wpf) (Figura 12B-D). Portanto, durante o desenvolvimento gonadal de machos, a diferenciação inicial das células germinativas, bem como a entrada das mesmas na meiose, podem estar envolvidas com a ação de Igf3, particularmente através do receptor Igf1rb.

### **5.2.6- Igf3 e Fsh induzem a proliferação de espermatogônias $A_{und}$ que é bloqueada pela ação de inibidor específico de receptores de Igf**

Uma vez que o Igf3 é expresso em células de Sertoli envolvendo espermatogônias do tipo A e estudos acerca da expressão gênica demonstraram que o Igf3 estimula a expressão de genes das células germinativas relacionados com a diferenciação e a meiose, a hipótese de que o Igf3 desempenha importante papel nas fases iniciais da proliferação espermatogonial rumo à diferenciação pode ser considerada bastante plausível. Neste contexto, o índice de proliferação das espermatogônias  $A_{und}$  foi avaliado em explantes testiculares incubados por 7 dias, na ausência ou presença de rzf Igf3. Conforme se observa na Figura 12G, a incorporação de BrdU aumentou significativamente ( $\sim 2$  vezes;  $p < 0,05$ ) nos testículos incubados com rzf Igf3. A utilização de potente e seletivo inibidor alostérico de IGF-1R resultou em drástica redução da proliferação de  $A_{und}$  estimulada por Igf3. Outros experimentos foram desenvolvidos para avaliar se o rzf Fsh seria capaz de exercer a sua função na proliferação espermatogonial através de via independente de Igf3. Assim, os testículos foram incubados com rzf Fsh + trilostano (inibidor da via androgênica), na ausência ou presença do inibidor (NVP-AEW541) acima citado. Os resultados encontrados mostraram que, embora em menor magnitude, o índice de proliferação de espermatogônias  $A_{und}$  apresentou-se reduzido ( $p < 0,05$ ) na presença do inibidor. Estes achados sugerem que a sinalização do Igf3 é a provável via desencadeadora da proliferação espermatogonial estimulada pelo FSH no testículo de zebrafish (Figura 12G), de forma independente de andrógenos.

## **5- DISCUSSÃO**

### 5.1- Efeitos da triiodotironina nos testículos de zebrafish

Em vertebrados, os hormônios tireoidianos (TH) exercem várias importantes funções e a expressão dos receptores de hormônios tireoidianos (THR) nos testículos sugere que os TH participam na regulação da reprodução em machos (Habibi et al., 2012) . No presente estudo, investigamos as eventuais funções do  $T_3$ , isoladamente ou em associação com rzf Fsh, na esteroidogênese e espermatogênese de zebrafish adultos, usando abordagens morfológicas, fisiológicas e moleculares.

É sabido que os TH atuam através de seus receptores intracelulares específicos e estudos sobre os níveis de RNAm de *thra* e *thrβ* nos testículos de truta comum, uma espécie de reprodução sazonal, demonstraram variações sazonais com expressão constante destes receptores durante todo o processo espermatogênico, enquanto padrão mais elevado de expressão foi observado após a estação reprodutiva (de Montgolfier et al., 2009). Entretanto, os diferentes tipos de células nos testículos que expressam os THR não têm sido claramente identificados em peixes. Em mamíferos, diferentes grupos de pesquisa observaram THR em células de Sertoli, enquanto marcação em células germinativas e células intersticiais ainda são controversas (Buzzard et al., 2000; Singh et al., 2011). Também em zebrafish, não há até o presente momento informações sobre os tipos celulares que expressam THR no testículo e esta informação é muito importante para o desenvolvimento de estudos avançados referentes às ações fisiológicas dos TH neste órgão.

No presente estudo, observamos que as células de Sertoli envolvendo células germinativas em diferentes fases da espermatogênese expressavam ambos THR investigados, enquanto as células de Leydig expressavam apenas *thrβ*. Observamos ainda marcação entre as células germinativas em vários tipos de cistos espermatogênicos (geralmente naqueles maiores). Filamentos intermediários (vimentina) presentes exclusivamente no citoesqueleto de células de Sertoli foram detectados entre as células germinativas de testículos de bacalhau (Chen et al., 2012). Marcação para receptor de Fsh entre as células germinativas foi observada através de IHC no testículo de enguia (Ohta et al., 2007). Estes resultados obtidos através de diferentes metodologias sugerem que as células de Sertoli que constituem um determinado cisto espermatogênico não se apresentam como uma simples formação semelhante a um saco, podendo se apresentar como estrutura mais complexa, inclusive se imiscuindo entre as células germinativas mais próximas ao lume do cisto, provavelmente através de prolongamentos citoplasmáticos. Futuros estudos morfológicos e ultraestruturais poderão fornecer maiores

evidências acerca dessa suposição. No entanto, coletivamente, nossos resultados indicam que em zebrafish os TH modulam as funções testiculares através de duas importantes células somáticas testiculares, as células de Sertoli e Leydig, enquanto os efeitos diretos sobre as células germinativas parecem ser menos prováveis.

À semelhança de outros vertebrados, a localização de *thra* nas células de Sertoli em zebrafish indica que este tipo celular é um importante alvo para a ação de TH, a qual parece estar evolutivamente conservada. Conforme encontrado em ratos (Canale et al., 2001; Rao et al., 2003), também detectamos *thrβ* em células de Leydig. Diferentemente de relatos em ratos, onde as células germinativas desde espermatogônias intermediárias até espermátócitos em paquíteno expressam *Thra1* (Buzzard et al., 2000; Canale et al., 2001), em zebrafish por nós investigados as células germinativas mostraram-se negativas para os THR. Neste contexto em particular, nossos resultados sugerem que os efeitos de TH sobre a proliferação de células germinativas e células de Sertoli são mediados pelos THR em células de Sertoli, enquanto a modulação da esteroidogênese pelo  $T_3$  é mediada pelo *Thrβ* nas células de Leydig. Apesar dos efeitos de  $T_3$  na modulação dos níveis de andrógenos já terem sido descritos em ratos *in vivo* (Sahoo et al., 2008), nossos estudos fornecem informações inéditas acerca modulação direta do TH na produção de andrógenos nos testículos de zebrafish (ver adiante).

No presente estudo, foi observado que o  $T_3$  aumentou significativamente os níveis de RNAm de *igfβ* em testículos mantidos por um dia em cultura. De forma interessante, este tipo de Igf é específico de gônadas em peixes, não estando, portanto, presente em vertebrados tetrápodes (Wang et al., 2008). Este fator de crescimento, que foi localizado em células de Sertoli de testículos de zebrafish adultos, pode desempenhar importante função na retomada da espermatogênese após injúria citotóxica (de Waal, 2009; Nóbrega et al., 2010). Em ratos hipotireóidicos, estudos *in vivo* mostraram que o  $T_3$  estimula significativamente a produção de IGF1 em células de Sertoli, o que de certa forma foi também observado *in vitro* em células de Sertoli de ratos incubadas com  $T_3$  (Palmero et al., 1990). Portanto, a ação estimulatória do TH sobre a liberação de membros da família Igf pelas células de Sertoli é um importante mecanismo que parece estar evolutivamente conservado em vertebrados. Os efeitos do *igfβ* em testículos de zebrafish serão discutidos mais pormenorizadamente no segundo tópico da discussão.

Quando incubados com  $T_3$ , fragmentos testiculares de trutas em fase de maturação, que apresentavam rápido crescimento gonadal, mostraram aumentos significativos nos níveis de RNAm de *cx43* (de Montgolfier et al., 2009). No presente estudo, comparado aos controles, os níveis de RNAm de *cx43* e *cx43.4* não aumentaram significativamente em testículos de zebrafish adultos expostos ao  $T_3$ . Entretanto, quando se comparou os níveis de *cx43* entre dois períodos de

incubação investigados, os níveis desta CX diminuíram após 1 dia, antes de mostrarem aumento significativo com 4 dias de cultura, no grupo tratado com T<sub>3</sub>. Numa determinada linhagem de células de Sertoli de camundongos, o TH aumentou a expressão dos níveis de RNAm de *Cx43* (St-Pierre et al., 2003; Gilleron et al., 2006) e inibiu a proliferação destas células. Estes achados foram associados com a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, tais como SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) e p27Kip1 (*cyclin dependent kinase inhibitor*), também conhecida como CDKN1B (Zhang et al., 1995; St-Pierre et al., 2003; Gilleron et al., 2006; Sridharan et al., 2007). Por outro lado, quando comparado com camundongos do tipo selvagem, o número de células de Sertoli aumentou cerca de 70% em camundongos *knockout* para *Cx43* em células de Sertoli (SC-*Cx43* KO), indicando que esta conexina está envolvida com a cessação do período de proliferação das células de Sertoli que ocorre no início da puberdade (Holsberger e Cooke, 2005). Em contraste, em testículos de zebrafish adultos o TH estimulou a proliferação de células de Sertoli. Assim, embora o TH possa desempenhar funções distintas nos testículos de peixes e mamíferos, os mecanismos relacionados à proliferação de células de Sertoli nestas duas distintas classes de vertebrados podem envolver a *down-regulation* de *Cx43*. À semelhança de trutas (de Montgolfier et al., 2007), vale ressaltar que no presente estudo não foram observadas alterações na expressão de *cx43.4*.

Os THR são fatores de transcrição regulados pelo seu ligante, os TH, que ao se ligarem a sequências de DNA de genes alvos podem interagir com complexos co-repressores e co-ativadores (Yen et al., 2006). Analisando os efeitos de T<sub>3</sub> sobre a expressão dos genes alvos selecionados, observamos que os dois genes específicos de células de Leydig, *star* e *insl3*, não sofreram alterações significativas, o que também ocorreu na liberação basal de andrógeno. De forma semelhante, em goldfish, experimentos *in vitro* demonstraram que o T<sub>3</sub> não alterou de forma significativa os níveis de andrógenos liberado (Habibi et al., 2012). Entretanto, em truta arco-íris, a liberação de estrógeno por folículos ovarianos em maturação (ovócitos vitelogênicos iniciais), estimulados pelo Fsh, foi amplificada pelo THs (Cyr e Eales, 1988). Em nossos estudos envolvendo testículos de zebrafish adultos foi também demonstrado que o T<sub>3</sub> potencializou os efeitos do Fsh na liberação de esteróides e na expressão gênica. Em testículos de ratos adultos com depleção de células de Leydig induzida por citotoxina específica (EDS), o tratamento com TH estimulou a formação de novas células de Leydig e resultou na secreção/liberação de andrógenos (Ariyaratne et al., 2000), enquanto em ratos adultos que foram mantidos hipotireóidicos transitoriamente, os níveis de testosterona circulante reduziram significativamente (Sahoo et al., 2008). Em zebrafish, o T<sub>3</sub> isoladamente não alterou a liberação de andrógenos, mas aumentou claramente a expressão gênica de *cyp17a1* e *ar*, bem como a liberação de andrógenos

estimulados pelo Fsh. As células de Leydig de peixes expressam *Fshr/fsbr* (Ohta et al., 2007; García-López et al., 2009) e o Fsh é um potente hormônio esteroidogênico em peixes (Planas et al., 1993; García-López et al., 2010). Uma vez que estudos prévios (Rao et al., 2003) têm demonstrado que os andrógenos não estimulam a expressão de *cyp17a1*, podemos atribuir a expressão aumentada deste gene ao Fsh. Assim, nossos resultados sugerem que na presença de rzf Fsh, o  $T_3$  potencializa os efeitos tróficos do Fsh na esteroidogênese, em testículos de zebrafish adultos. Ao mesmo tempo, pode ser considerado que o  $T_3$  também promoveu efeito permissivo pelo fato do aumento da expressão de *ar* ter ocorrido somente quando este hormônio estava associado com o Fsh. Assim, o  $T_3$  aumentou tanto a produção de andrógenos quanto a sensibilidade dos testículos de zebrafish adultos aos andrógenos. De maneira geral, nossos resultados corroboram a premissa de que o TH participa ativamente das vias clássicas de produção de andrógenos, o que foi recentemente proposto para vertebrados (Flood et al., 2013).

Nos testículos tratados com  $T_3$  por 4 dias, o percentual ocupado pelas espermatogônias  $A_{und}$  aumentou significativamente, achado este corroborado pelo maior índice de proliferação deste tipo particular de célula germinativa, bem como de células de Sertoli. De maneira interessante, em peixe-gato (*Clarias gariepinus*) tratados com tiouréia, que é um inibidor de TH, a espermatogênese apresentou-se comprometida, resultando em significativa redução nas contagens de espermátides/ espermatozoides (Swapna et al., 2006). Esta observação corrobora a hipótese de que a formação de espermatogônias do tipo A e de células de Sertoli estimuladas por TH são relevantes *in vivo*. De forma notável, em zebrafish o inibidor de receptor de Igf aboliu o aumento do índice mitótico de  $A_{und}$  estimulado por  $T_3$ , demonstrando que nos testículos deste teleosteo a proliferação deste tipo celular estimulada por este hormônio é mediada por fator que ativa os receptores de Igf.

Em mamíferos, os efeitos do  $T_3$  na proliferação de células de Sertoli têm sido amplamente discutidos. Assim, diversos estudos têm demonstrado que tanto o hipo quanto o hipertireoidismo afetam o número de células de Sertoli respectivamente através do alongamento ou encurtamento do período de proliferação deste tipo celular (Orth, 1982; Joyce et al., 1993; Auharek et al., 2010). Nossa observação de que o  $T_3$  estimula a proliferação de células de Sertoli contrasta com a situação em mamíferos. Por outro lado, pelo fato de acompanhar o crescimento e desenvolvimento dos cistos espermatogênico, a proliferação de células de Sertoli é um evento esperado em testículos de peixes adultos (Schulz et al., 2005); evento este que provavelmente envolve a ativação da sinalização do Fsh (Schulz et al., 2012). De forma interessante, no presente estudo, uma importante fração de células de Sertoli em proliferação estava em associação com espermatogônias do tipo A, enquanto número significativo aparentemente não se encontrava



associado (referidas como células de Sertoli 'livres') com nenhum tipo de célula germinativa. Isto sugere que este tipo de proliferação de células de Sertoli provavelmente gera uma fonte adicional de células de Sertoli que irá propiciar a formação de novos cistos de células germinativas, talvez mediado pelas THR expressos pelas células de Sertoli. Ainda, analisando a proliferação de células de Sertoli na presença do inibidor do receptor de Igf, o índice de incorporação de BdrU diminuiu, sugerindo que a proliferação de células de Sertoli estimulada por  $T_3$  é, pelo menos em parte, mediada pela sinalização de Igf/Igfr. Assim, nossas observações em zebrafish parecem corroborar as conclusões baseadas em estudos *in vitro* de células de Sertoli de camundongos, onde a inativação do gene do IGF-1R diminuiu a proliferação de células de Sertoli e também aumentou a apoptose deste tipo celular (Froment et al., 2007). Além disso, estudo recente demonstrou que a perda específica da sinalização insulina/IGF em células de Sertoli de camundongos reduziu significativamente a proliferação de células de Sertoli e o tamanho dos testículos (Pitetti et al., 2013). Desta forma, no presente estudo propomos a existência de mecanismo evolutivamente conservado, o qual, mediado por Igfs (em particular o Igf3 em peixes), estimula a proliferação de células de Sertoli em zebrafish.

Considerando que as células germinativas não expressam THR, os aumentos observados no número e índice mitótico de  $A_{und}$ , induzidos pelo  $T_3$ , poderiam ser mediados pelas células somáticas testiculares, possivelmente células de Sertoli. Neste contexto, conforme já aventado, o número aumentado de células de Sertoli pode ter permitido a expansão física desta população espermatogonial (cistos iniciais), além de propiciar maior produção de fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento/ viabilidade destas células germinativas. Uma vez que nossos resultados demonstraram que, estimuladas por  $T_3$ , a via de sinalização de Igf mediou a proliferação de células de Sertoli e de espermatogônias  $A_{und}$ , seria bastante tentador especular que o Igf3 produzido sob estímulo do  $T_3$  exerceria efeitos autócrino na proliferação de células de Sertoli e parácrino na proliferação espermatogonial. De forma interessante, nos testículos de truta arco-íris a expressão de receptores de Igf tem sido descritos em células somáticas e germinativas (Le Gac et al., 1996). Assumindo que as células de Sertoli recém-formadas associam-se com espermatogônias  $A_{und}$  e, portanto, formam novos cistos espermatogênicos, este evento aumentaria sobremaneira a capacidade espermatogênica dos testículos. Por outro lado, o hipotireoidismo induzido *in vivo* em tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) púbere, aumentou o número de células de Sertoli e de células germinativas por cisto (Matta et al., 2002). Este efeito não é exatamente oposto ao que nós observamos em zebrafish adultos, uma vez que foi o tamanho, mas não o número, de cistos que aumentou nos testículos de tilápia púbere. Assim, conforme descrito previamente em mamíferos (Laslett et al., 2000), o  $T_3$  pode desempenhar

diferentes funções, dependendo do estágio de desenvolvimento ontogenético e das espécies investigadas.

## **5.2- Regulação endócrina e atividade biológica do fator de crescimento semelhante à insulina 3 (Igf3/*igf3*)**

Conforme já foi mencionado em outros tópicos, os principais objetivos desta vertente do presente trabalho foram os de se investigar, utilizando várias técnicas, as eventuais funções e a regulação do fator de crescimento semelhante à insulina 3 (Igf3/*igf3*) nas gônadas de zebrafish. Em vertebrados já é classicamente sabido que a espermatogênese é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada (H-H-G), que sob estímulo do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) libera o FSH e o LH, que atuam como importantes mediadores na função gonadal através da produção de hormônios esteróides, bem como de diversos fatores de crescimento essenciais para a espermatogênese (Russell et al., 1990; Schulz et al., 2010).

No presente item da discussão iremos abordar de forma mais detalhada e específica a ação biológica do Fsh sobre a função testicular de zebrafish. Em outras espécies de peixes, tais como a truta arco-íris, o salmão prateado, e no próprio zebrafish, foi observado que o Fsh estimulou a liberação de andrógenos. Ação esta já conhecida em teleósteos (Planas et al., 1993; Planas e Swanson, 1995; García-López et al., 2010; Sambroni et al., 2013), nos quais, também sob o estímulo do Fsh, a expressão de genes relacionados com o sistema esteroidogênico, tais como *cyp17a1* e *star* (García-López et al., 2010; Sambroni et al., 2013), foi encontrada.

Conforme já tem sido demonstrado e será discutido abaixo, os Igfs são fatores de crescimento bastante relevantes para a espermatogênese (Reinecke, 2010), podendo induzir este processo em tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*; Tokalov et al., 2005) e em enguia (*Anguilla japonica*; Nader et al., 1999). Demostramos no presente estudo utilizando zebrafish que, sob influência de rzf Fsh, a expressão gênica de membros da família de fatores de crescimento à insulina (Igf) foi estimulada tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Entretanto, a partir da análise dos efeitos do rzf Lh na expressão gênica dos Igfs, foi encontrado que é principalmente através do Fsh que os níveis de RNAm destes genes são estimulados. Ainda, com a finalidade de se avaliar a influência de andrógenos, induzida pelo Fsh e Lh, sobre a expressão dos Igfs, inibidor alostérico da  $3\beta$ -Hsd foi também adicionado na cultura dos explantes testiculares. Nestas condições, nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de RNAm dos membros da família Igf, indicando que a expressão dos mesmos é regulada diretamente pelo Fsh e Lh, independentemente de andrógenos.

Ainda de forma independente de andrógenos, em explantes cultivados por 7 dias o Fsh estimulou a proliferação de espermatogônias do tipo A, tanto em testículos de zebrafish *vasa::egfp* quanto em testículos de animais selvagens. À semelhança de nossos achados, foi demonstrado *in vitro* que o Fsh estimulou a proliferação de espermatogônias de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*; Loir, 1999). No presente estudo, demonstramos também que o Fsh foi capaz de induzir aumento da produção de células espermatogênicas haplóides. Em mamíferos, particularmente em roedores de laboratório, já está bem caracterizado que os andrógenos exercem importante papel na compleição da fase meiótica da espermatogênese (Zhang et al., 2001). Ainda em roedores, tem sido demonstrado que, na ausência de Fsh ou do receptor desta gonadotrofina, o número total de células de Sertoli e de células germinativas por testículo reduzem substancialmente, além de ocorrer diminuição da qualidade dos espermatozoides (Abel et al., 2000, 2009, Kumar, 2005, Huhtaniemi, 2006).

A insulina, bem como os fatores de crescimentos a ela relacionados (IGF1 e IGF2), pode modular uma variedade de eventos biológicos, incluindo-se a sobrevivência celular, estímulo à proliferação e diferenciação celular, e o metabolismo (Nakae et al., 2001). No presente estudo, demonstramos que o rzf Fsh, de forma independente de andrógenos, elevou significativamente os níveis de RNAm de genes da família Igf, em especial, o gene *igf3* que, conforme já foi mencionado é um fator de crescimento específico das gônadas de peixes (Wang et al., 2008). Estes níveis foram ainda mais elevados quando a espermatogênese endógena de zebrafish foi depletada/diminuída pelo busulfan (Nóbrega et al., 2011) e pelo tratamento *in vivo* com E2 (de Waal et al., 2009). Somado ao fato de que o Fsh foi capaz de estimular a espermatogênese de forma independente de andrógenos, estes resultados sugerem que a proliferação espermatogonial estimulada pelo o rzf Fsh nos testículos de zebrafish poderia ser mediada por fatores de crescimento produzidos pelas células de Sertoli e um dos fortes candidatos pode ser o Igf3. Neste contexto, estudos recentes demonstraram que os níveis de RNAm de *igf3* apresentavam-se significativamente aumentados em testículos de truta arco-íris tratadas com Fsh (Sambroni et al., 2013). Em camundongos, foi também observado *in vitro* que o FSH estimulou a produção de IGF1, fator de crescimento este que parece ser importante na regulação do crescimento testicular e magnitude da produção espermática em mamíferos (Cailleau et al., 1990; Pitetti et al., 2013).

Investigando-se a localização de *igf3* por ISH, Wang e colaboradores (2008) demonstraram que este fator é expresso por células da granulosa em ovários de tilápia nilótica e no compartimento intertubular dos testículos desta mesma espécie. Nossos resultados demonstraram que, tanto nos testículos de zebrafish do tipo selvagem quanto naqueles mutantes, ou seja, sem células germinativas, nenhuma alteração nos níveis de RNAm de *igf3* foi observada,

indicando que a expressão deste fator encontrava-se nas células somáticas do testículo. Através de ISH, demonstramos que, no compartimento tubular, as células de Sertoli envolvendo espermatogônias do tipo A, em fases iniciais de desenvolvimento/diferenciação, são aquelas que expressam RNAm de *igf3*. Ainda, através de IHC demonstramos que a proteína Igf3 estava também localizada em células de Sertoli envolvendo espermatogônias do tipo A. Estes importantes resultados sugerem que o Igf3, sob influência do Fsh, é produzido pelas células de Sertoli, que desta maneira regulariam a proliferação espermatogonial, o que também é sugerido em mamíferos (Söder et al., 1992; Yagci et al., 2006; Pitetti et al., 2013).

O elemento de ligação responsivo ao AMP-cíclico (CREB) e o fator de transcrição dependente de AMP-cíclico 1 (ATF-1) são componentes importantes da cascata desencadeada pela insulina/IGFs (Schindler et al, 2013). Análise *in silico* das regiões promotoras do gene *igf3* do zebrafish revelou a presença de sítios CRE e ATF-1. Conforme demonstrado no presente trabalho, estes fatores de transcrição mostraram-se bastante importantes para a expressão do gene *igf3*, uma vez que mutações pontuais nas sequências CRE e ATF-1 reduziram significativamente a atividade da luciferase. Estudo da região promotora do *igf3* de tilápia nilótica demonstrou que a atividade da luciferase encontrava-se aumentada em resposta ao tratamento com a forskolina, que sabidamente eleva os níveis de cAMP intracelular (Li et al., 2012). No presente trabalho, analisando-se esta via de sinalização e a dependência de cAMP para a expressão do *igf3* em explantes testiculares, verificou-se que, na presença de inibidores da via do cAMP, mesmo quando os explantes foram tratados com o Fsh, a expressão do gene *igf3* encontrava-se inibida. Estes resultados sugerem fortemente que a produção de cAMP estimulada pelo Fsh, bem como a cascata desencadeada por este mensageiro, são fundamentais para a expressão do *igf3*. A utilização destas vias de sinalização, que está ligada a ativação do IGF-1R, é conhecida por induzir diversas respostas biológicas, tais como, por exemplo, a estimulação da proliferação, diferenciação e migração de células em mamíferos (Petley et al., 1999).

Conforme já foi aventado, a maioria das ações biológicas dos IGFs é exercida através da ativação do IGF-1R (Czech, 1989). Por exemplo, em truta arco-íris (Le Gac et al., 1996) foi demonstrado que o Igf-1R é expresso em células de Sertoli, espermatogônias e em espermatócitos. Enquanto em mamíferos, o IGF-1R foi encontrado em células de Sertoli, Leydig e em espermatócitos (Tres et al., 1986; Antich et al., 1995). Durante o desenvolvimento gonadal de zebrafish, a análise da expressão de *igf3*, *igf1ra* e *igf1rb* mostrou que a diferenciação das células germinativas, bem como a entrada da meiose em machos (oito semanas) parecem estar relacionadas com a ação de Igf3, particularmente através do receptor Igf1rb presente nas células germinativas. Em tilápias nilóticas, também durante o desenvolvimento gonadal, foi observado

que a expressão de *igf3* ocorreu de forma contínua nos testículos, enquanto nos ovários deste teleosteo a expressão de *igf3* reduziu gradativamente (Berishvili et al., 2010). No intuito de se elucidar quais seriam as possíveis células-alvo do Igf3 em zebrafish adultos, no presente estudo investigamos, em experimentos envolvendo suspensão de células testiculares, o padrão de expressão dos receptores de Igfs descritos para este teleosteo. O fato de nossos resultados terem mostrado que a expressão de *Igf1ra* não é exclusiva das células somáticas dos testículos sugere que os Igfs podem exercer suas ações nas células germinativas através deste receptor. No entanto, a observação de que a expressão do receptor *Igf1rb* ocorre predominantemente nas células germinativas nos permite hipotetizar que o Igf3 exerceria sua ação preferencialmente através desta via (*Igf3/ Igf1rb*).

No presente estudo já foi comentado que os Igfs promovem o crescimento das gônadas, tanto durante o período de desenvolvimento quanto nos animais adultos (Berishvili et al., 2010). Utilizando explantes testiculares, verificamos que o rzf Igf3 foi capaz de induzir alterações no padrão de expressão de genes testiculares, tais como o *pivl2* (Houwing et al., 2008) e *dazl* (Reynolds et al., 2007; Chen et al., 2013). Ainda, mostramos pela primeira vez que este fator de crescimento foi capaz de reestabelecer a espermatogênese em testículos tratados com E2 (enriquecidos com espermatogônias do tipo  $A_{und}$ ), de forma independente de andrógenos. Assim, ao contrário do observado em tilápia nilótica, na qual a proteína recombinante de Igf3 foi capaz de induzir a expressão de enzimas esteroidogênicas (Li et al., 2012), no presente trabalho a expressão de genes tais como *cyp17a1* e *star* não foi alterada, bem como a liberação de andrógenos, mesmo quando os testículos foram incubados com Igf3 em associação com o Fsh. Estes resultados sugerem que o Igf3 atua nos testículos de zebrafish sem a influência de andrógenos.

No presente estudo demonstramos que nos testículos de zebrafish o Fsh foi capaz de estimular a proliferação de espermatogônias  $A_{und}$  e que a expressão de *igf3* foi significativamente estimulada por esta gonadotrofina, o que nos levou a investigar quais seriam os efeitos do rzf Igf3 na proliferação espermatogonial. Assim, observamos que na presença de Igf3 o índice mitótico destas células germinativas apresentou-se consideravelmente aumentado, indicando que este fator de crescimento participa ativamente no processo de diferenciação das espermatogônias do tipo A. Embora informações na literatura sejam ainda escassas, os trabalhos disponíveis até o presente momento sugerem que o *Igf3/igf3* está diretamente relacionado com a reprodução e com o status reprodutivo das espécies investigadas (Wang et al., 2008; Berishvili et al., 2010; Li et al., 2012; Sambroni et al., 2013). Ainda, na tentativa de elucidar a via de proliferação estimulada pelo Fsh nos testículos de zebrafish e a dependência ou não da ação de Igf3 neste processo, os testículos

de zebrafish foram incubados com Igf3 ou Fsh + trilostano, na presença ou ausência do inibidor alostérico de IGF-1R, o NVP-AEW541. A eficácia do inibidor utilizado na proliferação de espermatogônias  $A_{und}$ , estimulada pelo Igf3, foi demonstrada pela redução do índice mitótico após 7 dias de cultura. Resultados semelhantes (Morais et al., 2013) foram demonstrados quando testículos de zebrafish foram incubados com a triiodotironina na presença deste inibidor, sugerindo que a via de sinalização de Igfs é fundamental para a proliferação espermatogonial. Já após análise dos explantes testiculares tratados com Fsh + trilostano, na presença ou ausência do mesmo inibidor, observamos que o índice mitótico de espermatogônias  $A_{und}$  retornou aos níveis observados para o controle. Em conjunto, estes resultados sugerem fortemente que, através de Igf3, o Fsh exerce sua ação na proliferação das espermatogônias  $A_{und}$ , de forma independente de andrógenos.

## **6- CONCLUSÕES**

## 6- Conclusões

---

A partir dos principais resultados encontrados, os seguintes pontos podem ser destacados, conforme seguem, para as duas vertentes deste trabalho.

- 1- No nosso conhecimento, o presente estudo foi o primeiro a investigar os efeitos diretos do  $T_3$  em testículos de zebrafish adultos. Observamos que esses efeitos são coordenados através de receptores de hormônios tireoidianos expressos pelas células de Sertoli e Leydig. Isoladamente, o  $T_3$  estimulou a proliferação de células de Sertoli e de espermatogônias  $A_{und}$ , envolvendo principalmente a participação de Igf3. Já em associação com o Fsh, o  $T_3$  potencializou a atividade esteroidogênica desta gonadotrofina, além de aumentar a sensibilidade testicular aos andrógenos. É sabido que estes hormônios esteróides estimulam a espermatogênese de peixes e mamíferos, em particular as fases mais avançadas (meiose/espermio gênese) de diferenciação das células germinativas. Neste contexto, hipotetizamos que a ação conjunta de  $T_3$  e Fsh nos testículos de zebrafish resulta na formação de novos cistos espermatogênicos, os quais, por sua vez, e com a participação de andrógenos, seriam estimulados a se diferenciarem.
- 2- Em relação aos estudos nos quais a regulação e a atividade biológica do Igf3/*igf3* foram investigadas, mostramos também, pela primeira vez, os efeitos diretos da proteína *zrf Igf3* nos testículos de zebrafish adultos. Assim, demonstramos que este fator de crescimento é regulado pelo Fsh, sem a participação de andrógenos. Demonstramos ainda que o Igf3, ao promover a proliferação de espermatogônias  $A_{und}$ , também de forma independente de andrógenos, foi capaz de reestabelecer a espermatogênese nos testículos de zebrafish adultos. Em síntese, nossos estudos mostram que o Fsh pode estimular a espermatogênese em zebrafish sexualmente maduros, via estimulação da expressão do fator de crescimento Igf3. Portanto, os resultados do presente estudo fornecem importantes e inéditas informações acerca do melhor entendimento da regulação da função dos testículos de zebrafish adultos.



## **7- PERSPECTIVAS**

## 7- Perspectivas

---

Dentre outros aspectos, os estudos desenvolvidos no presente trabalho nos permitiram inferir algumas importantes funções acerca dos efeitos do fator de crescimento semelhante à insulina 3 (*Igf3/igf3*) na função testicular de zebrafish sexualmente maduros, particularmente no que se refere às suas ações nas células germinativas mais iniciais (espermatogônias do tipo A indiferenciadas ou  $A_{und}$ ). A partir dos resultados obtidos, novos experimentos poderão ser desenvolvidos visando avaliar os possíveis efeitos deste importante fator de crescimento no processo de auto-renovação das espermatogônias  $A_{und}$ . Assim, com esta finalidade, zebrafish poderão ser submetidos, por exemplo, à técnica de “pulse-chase” para incorporação *in vivo* de 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) pelas espermatogônias  $A_{und}$  (Figura suplementar 4). Esta técnica, previamente descrita por Nóbrega e colaboradores (2009) para esta espécie, possibilita identificar as espermatogônias indiferenciadas que apresentam ciclo mitótico lento, característica esta de uma das subpopulações de espermatogônias-tronco (SSC). Com a utilização desta técnica, na qual, a partir da progressão normal da espermatogênese as células germinativas em fases mais avançadas de diferenciação (espermição) e marcadas com BrdU deixam o epitélio seminífero, os testículos serão coletados e incubados por 30 horas com 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU), na presença ou ausência de *rzf Igf3* (Figura suplementar 4). Após cultura, os testículos serão coletados, fixados em paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) e incluídos em paraplast. As secções dos testículos serão então submetidas à técnica de imunofluorescência para a detecção de BrdU (alexia 488) e EdU (alexia 546). Desta forma, será possível responder importantes questionamentos acerca do processo de auto-renovação de espermatogônias  $A_{und}$ , particularmente nos aspectos que se referem às SSC de teleósteos peixes.

A partir da análise e quantificação de espermatogônias  $A_{und}$  marcadas com Edu ou Edu+BrdU, poderemos elucidar se o *rzf Igf3* é capaz de induzir a auto-renovação de  $A_{und}$ , bem como se é capaz de estimular a proliferação/diferenciação destas células. Outro importante aspecto deste processo que poderemos elucidar é aquele que diz respeito às divisões simétrica e assimétrica das SSC. Pois, caso seja observado num determinado cisto contendo duas espermatogônias, que uma delas apresenta marcação apenas para BrdU, enquanto outra apresenta marcação para ambos os marcadores de proliferação, será demonstrado que as espermatogônias indiferenciadas se dividem assimetricamente. Pelo fato de trabalhos recentes em roedores considerarem que todas as células espermatogoniais do tipo A indiferenciadas (isoladas, pareadas e alinhadas) seriam funcionalmente SSC, este importante aspecto poderá também, de forma inédita, ser investigado em teleósteos.

Nosso grupo recentemente estudou os efeitos diretos do rzf Amh na espermatogênese do zebrafish, bem como os efeitos do Fsh sobre a expressão testicular deste hormônio (Nóbrega et al., 2009; Skaar et al., 2011). Nestes trabalhos, foi demonstrado que o Amh impede a proliferação de espermatogônias indiferenciadas, dentre elas as SSC, nos testículos de zebrafish sexualmente maduros, sugerindo fortemente que este fator de crescimento pode estar envolvido na regulação da atividade espermatogonial. Por outro lado, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o rzf Igf3 atua predominantemente na indução da proliferação/diferenciação das espermatogônias indiferenciadas nos testículos de zebrafish e que este fator de crescimento também tem a sua expressão regulada pelo Fsh. Neste contexto, serão realizados explantes testiculares para estudos envolvendo a expressão dose e tempo-dependente dos genes *amb* e *igf3*, em resposta ao rzf Fsh. Os eventuais resultados obtidos poderão auxiliar na melhor compreensão do mecanismo pelo qual o Fsh atuaria no nicho espermatogonial, através da ação dos fatores de crescimento em questão. Experimentos serão também desenvolvidos com a finalidade de se avaliar, em cultura, os efeitos destes dois fatores de crescimento recombinantes na atividade proliferativa das espermatogônias indiferenciadas. Assim, explantes testiculares poderão ser incubados da seguinte maneira: 1) 10 µg/mL de Amh (controle) versus 10 µg/mL Amh + 100 ng/mL Igf3 (tratado) e; 2) 100 ng/mL Igf3 (controle) versus 10 µg/mL Amh + 100 ng/mL Igf3 (tratado). Pretendemos também avaliar através de ISH se as células de Sertoli envolvendo uma mesma espermatogônia  $A_{und}$  co-expressam Amh e Igf3 ou se o padrão de expressão destes fatores de crescimento ocorre de forma isolada.

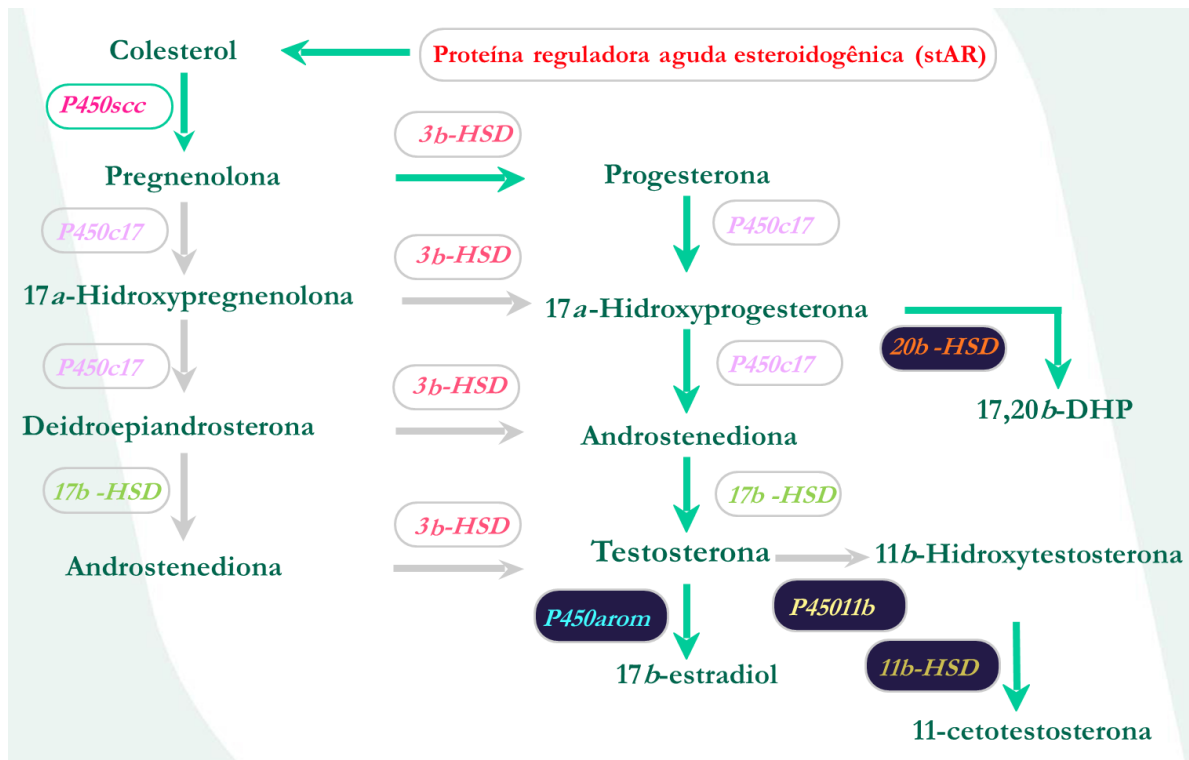
## **8- LISTA DE FIGURAS**

**Tabela 1:** Primers usados para estudos da expressão gênica e para gerar moldes de DNA para a síntese de sondas de RNAc marcadas com digoxigenina (DIG) para hibridização *in situ*.

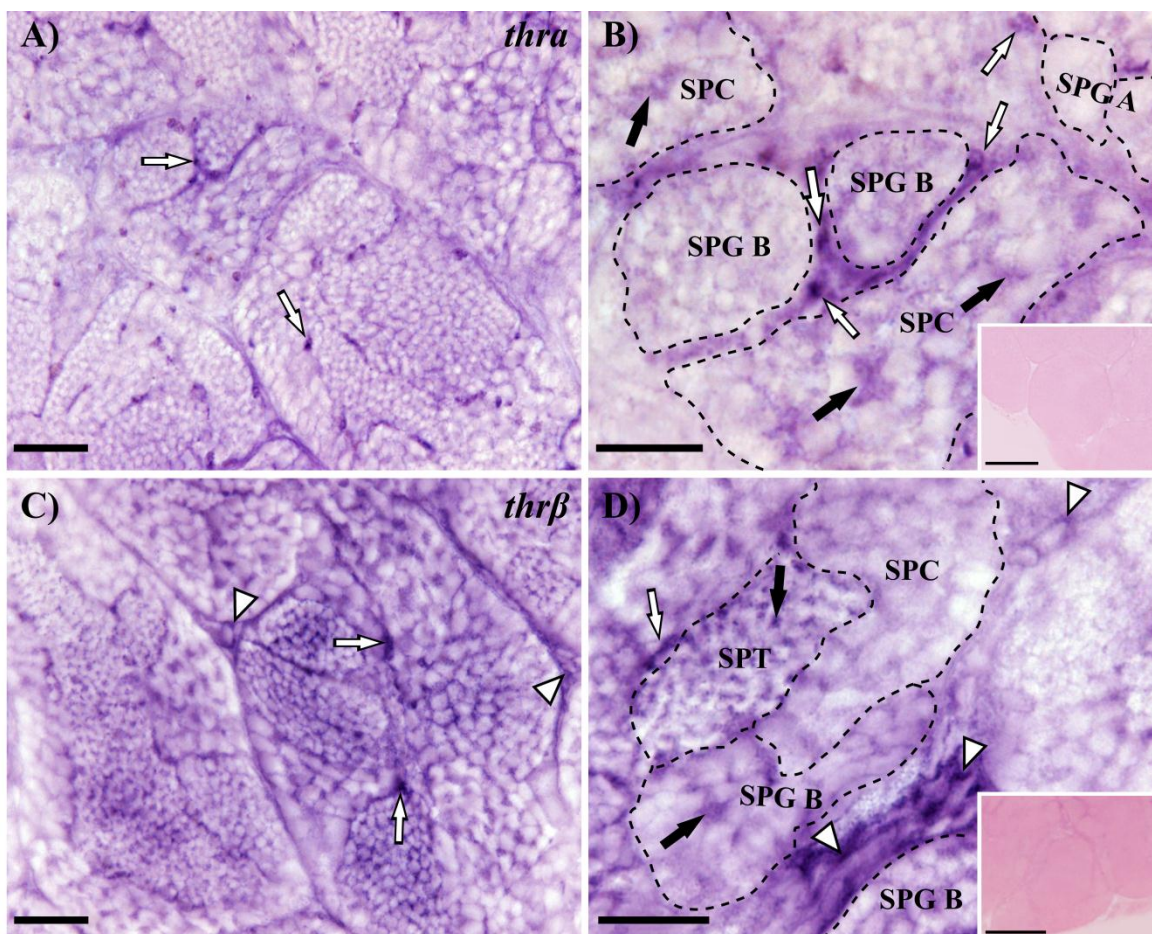
Gene alvo	Primers	Sequências (5'→3')
<i>amh</i>	AD (Fw)	CTCTGACCTTGATGAGCCTCATT
	AE (Rv)	GGATGTCCTTAAGAACITTTTGCA
	AF (probe)	FAM-ATTCCACAGGATGAGAGGCTCCCATCC-TAMRA
<i>gsdf</i>	2366 (Fw)	CATCTGCGGGAGTCATTGAAA
	2367 (Rv)	CAGAGTCCTCCGGCAAGCT
<i>eflα</i>	AG (Fw)	GCCGTCCCACCGACAAG
	AH (Rv)	CCACACGACCCACAGGTACAG
	AI (probe)	FAM-CTCCAATTTTGTACACATCTGAAAGTGGCA-TAMRA
<i>igfl</i>	2394 (Fw)	CCCAGGACACCAAAGAAACCTA
	2395 (Rv)	CGGCTCGAGTTCTTCTGATGA
<i>igf2a</i>	3079 (Fw)	GGCTTCTATTTTCAGTCGACCAACTAG
	3080 (Rv)	ACTAAAACAACACTCCTCCACAATCC
<i>igf2b</i>	3077 (Fw)	CTGCCATGGATGATTACCATGTATT
	3078 (Rv)	CATGGACAATGACAGAACGAAGAC
<i>igf3</i>	2680 (Fw)	TGTGCGGAGACAGAGGCTTT
	2681 (Rv)	CGCCGCACTTTCTTGGATT
<i>igflra</i>	2362 (Fw)	TACATCGCTGGCAACAAGCA
	2363 (Rv)	TCATTGAAACTGGTCTTATGCAAT
<i>igflrb</i>	2595 (Fw)	GTGCTGGTCTCTCCACACTCT
	2596 (Rv)	TTACCGATGTCTGTTGCCAATATC
<i>shippo1</i>	2791 (Fw)	GATGCCTGGAGACATGACCAA
	2792 (Rv)	CAAAGGAGAAGCTGGGAGCTTT
<i>sycp3l</i>	2730 (Fw)	AGAAGCTGACCCAAGATCATTCC
	2731 (Rv)	AGCTTCAGTTGCTGGCGAAA
<i>fshr</i>	2552 (Fw)	GAGGATTCCCAGTAATGCTTTCTCT
	2553 (Rv)	TCTATCTCACGAATCCCGTTCTTC
<i>lhr</i>	2548 (Fw)	CGCTCAGTACCATCCAATGCT
	2549 (Rv)	TTGAAGGCATGGCTCTCTATTTCT
<i>pgr</i>	2901 (Fw)	GGATTGTCAGATGGTCCAAATCTC
	2902 (Rv)	GCCCATCCAGGAATACTGAATTAGT
<i>fgf8</i>	2470 (Fw)	TTTTGCTACTATGCTCAGGTAACCA
	2471 (Rv)	GTCCGTCACCTTACTTTGCTCACT
<i>cx43</i>	3856 (Fw)	CTACAGGGCTCTCCACTCTTTACTTCT
	3858 (Rv)	CGCACTCCAGTCAACCATCT
<i>cx43.4</i>	3859 (Fw)	CGTAGCTGAGGAAAAAGAGTGGAAA
	3860 (Rv)	CGTAAGAAAACCTCCAGCTCATGGT
<i>ar</i>	2412 (Fw)	ACGTGCCTGGCGTGAAAA
	2413 (Rv)	CAAACCTGCCATCCGTTGAAC
<i>insl3</i>	2466 (Fw)	TCGCATCGTGTGGGAGTTT
	2467 (Rv)	TGCACAACGAGGTCTCTATCCA
<i>star</i>	2546 (Fw)	CCTGGAATGCCTGAGCAGAA
	2547 (Rv)	ATCTGCACTTGGTTCGCATGAC
<i>cyp17a1</i>	2773 (Fw)	GGGAGGCCACGGACTGTTA
	2774 (Rv)	CCATGTGGAACGTAGTCAGCAA
<i>dazl</i>	3104 (Fw)	AGTGCAGACTTTGCTAACCCCTTATGTA
	3105 (Rv)	GTCCACTGCTCCAAGTTGCTCT
<i>piwil1</i>	2542 (Fw)	GATACCGCTGCTGGAAAAAGG
	2543 (Rv)	TGGTTCTCCAAGTGTGCTTTGC
<i>piwil2</i>	2994 (Fw)	TGATACCAGCAAGAAGAGCAGATCT
	2995 (Rv)	ATTTGGAAGGTCACCCTGGAGTA
<i>thrx</i>	3691 <sup>a</sup> (Fw)	T3Rpps-TCAAACAAATAACATACTAACACTTTCCTTCTAAGTGA
	3692 <sup>b</sup> (Rv)	T7Rpps-CCATTGCGTCTCATCTCCTTCTG
<i>thrxβ</i>	3695 <sup>a</sup> (Fw)	T3Rpps-TCATTTTCAGGCCACGTATGTCCGATC
	3696 <sup>b</sup> (Rv)	T7Rpps-TAACTTGGTATGTACCCATTCTGCATGGCCCTC
<i>igf3</i>	2878 <sup>a</sup> (Fw)	T3Rpps-GGGCCAGAGCAGCTGCG
	2879 <sup>b</sup> (Rv)	T7Rpps-GGATGTGAGAGATGAATGTTGGCGT

<sup>a</sup>Primer 3691 e 3695 contendo a sequência promotora de RNA T3 polimerase (sublinhado) na sua extremidade 5' (T3Rpps; 5'-GGG CGGGTGTATTAACCTCACTAAAAGGG-3')

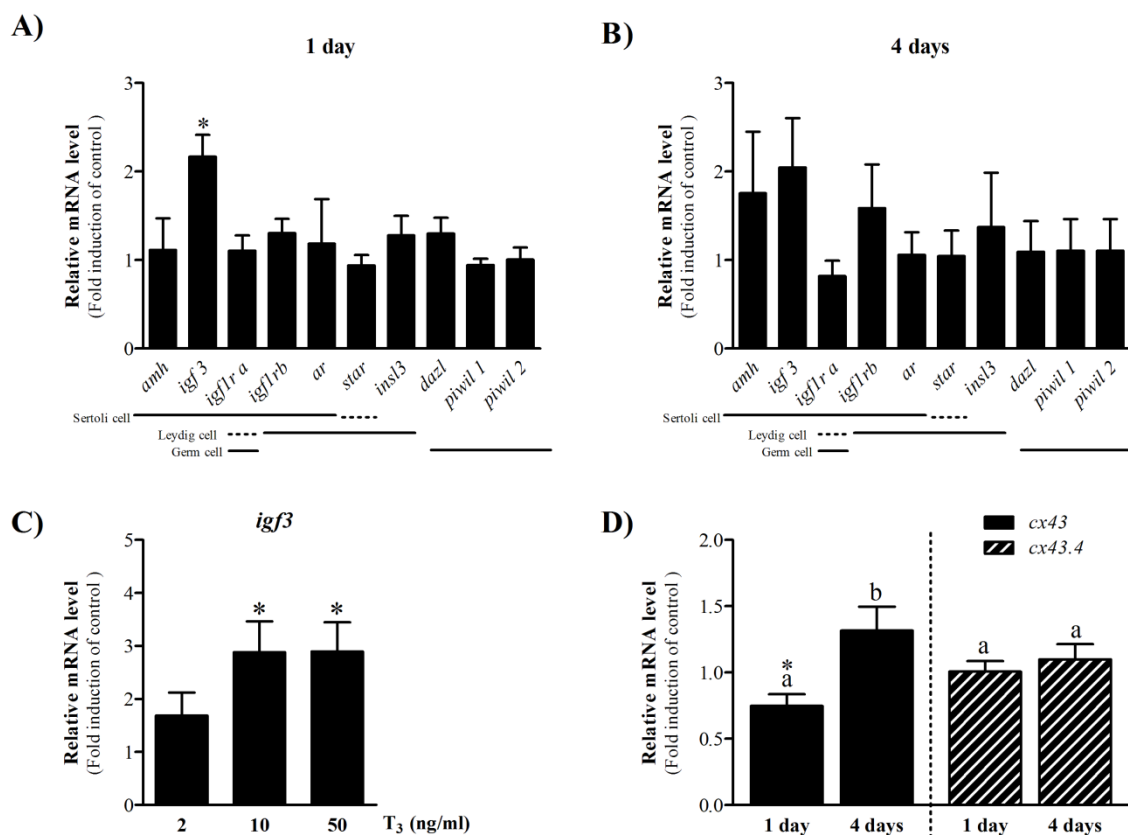
<sup>b</sup>Primer 3692 e 3696 contendo a sequência promotora de RNA T7 polimerase (sublinhado) na sua extremidade 5' (T7Rpps; 5'-CCG GGGGTGTAATACGACTCAC TATAAGGG-3')



**Figura I – Esquema ilustrativo em que são mostradas as principais vias para a produção de esteróides sexuais e as enzimas esteroidogênicas envolvidas.** Enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (P450scc); Esteróide 17 alfa-mono-oxigenase ou Citocromo P450 17 alfa (P450c17/cyp17a); 17-beta-hidroxisteróide desidrogenase (17b-HSD); 3-beta-hidroxisteróide desidrogenase (3b-HSD); 20-beta-hidroxisteróide desidrogenase (20b-HSD); Aromatase (P450arom); Esteróide 11 beta-hidroxilase ou Citocromo P450 11 beta (P45011b/cyp11b) e 11-beta-hidroxisteróide desidrogenase (11b-HSD).



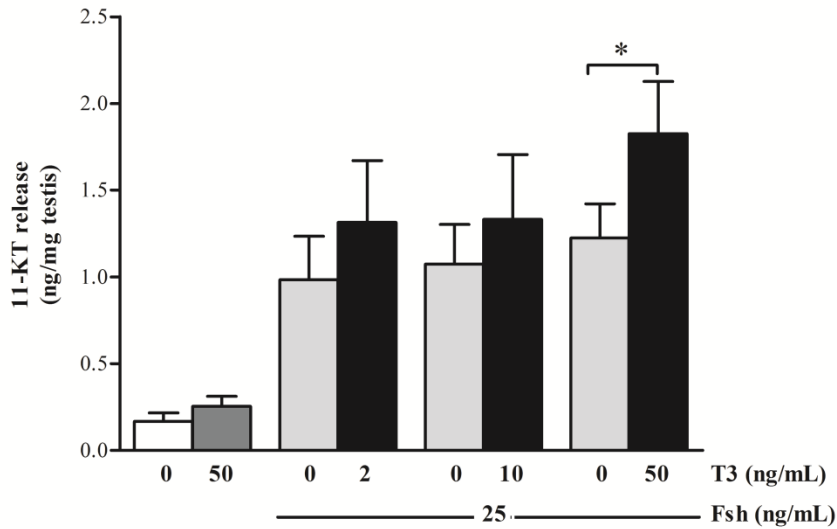
**Figura 1 – Localização de RNAm dos receptores de hormônios tireoidianos nos testículos de zebrafish usando hibridização *in situ*.** Menor (A e C) e maior (B e D) aumento de secções histológicas de testículos de zebrafish com 7  $\mu\text{m}$  de espessura, hibridizados com sondas de RNAc (antisense) de *thra* e *thrβ*. Marcação para RNAm de *thra* (A e B) foram encontradas em células de Sertoli (seta em branco) envolvendo células germinativas em diferentes estágios de diferenciação, enquanto marcação para RNAm de *thrβ* (C e D) foi identificada em células de Sertoli (seta em branco) e de Leydig (cabeça de seta). Sinal para ambos os receptores foi também observado entre as células germinativas (seta em preto). Conforme esperado, nenhuma marcação específica foi observada com as sondas de RNAc senso (detalhe em B e D). Linhas pontilhadas delimitam cistos contendo espermatogônias do tipo A diferenciadas (SPG A), espermatogônias do tipo B (SPG B), espermatócitos (SPC) e espermatídes (SPT). Os diferentes tipos de células germinativas foram caracterizados levando-se em consideração o tamanho e número de células por cisto, conforme Leal e colaboradores (2009). Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



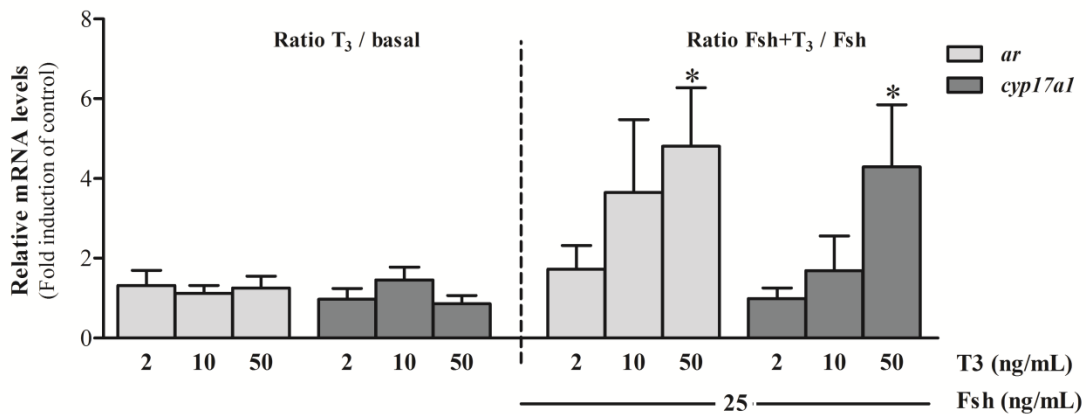
**Figura 2 – Análise da expressão gênica com 1 ou 4 dias após cultura de testículos de zebrafish. A- B)** Níveis relativos de RNAm de genes específicos de células de Sertoli, Leydig e germinativas de explantes testiculares incubados com  $T_3$  (50 ng/mL). As colunas representam o quociente de equivalência entre os níveis relativos de RNAm do grupo tratado sobre o controle. Por outro lado, as linhas sólidas indicam a presença dos diversos genes investigados nos três diferentes tipos de células testiculares considerados, enquanto as linhas pontilhadas indicam genes que possivelmente seriam expressos nestes tipos celulares. **C)** Níveis relativos de RNAm de *igf3* após  $T_3$ -dose resposta com 1 dia de incubação (n = 6). **D)** Níveis testiculares de RNAm de duas conexinas (*cx43* e *cx43.4*) presentes em testículos expostos por 1 ou 4 dias com  $T_3$ . Para cada gene investigado, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os dois períodos de tempo de incubação estudados. Já o asterisco indica diferença significativa entre os grupos tratado e controle ( $p < 0,05$ ).



A)

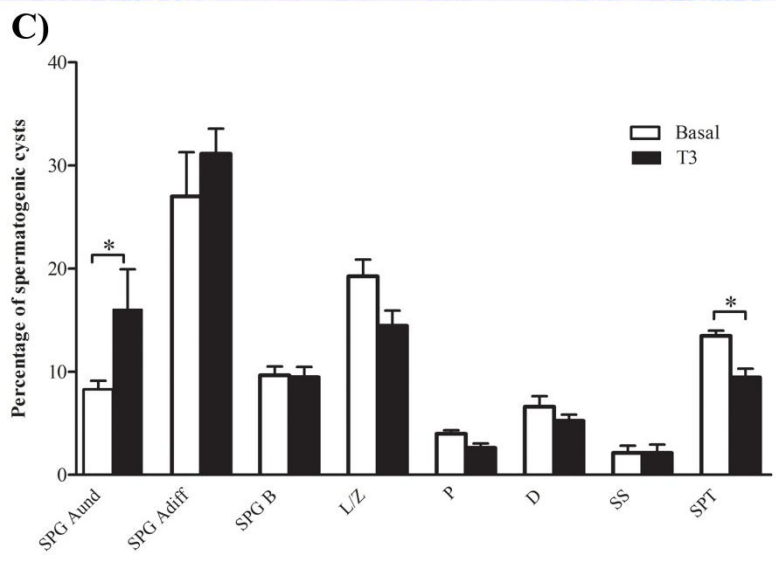
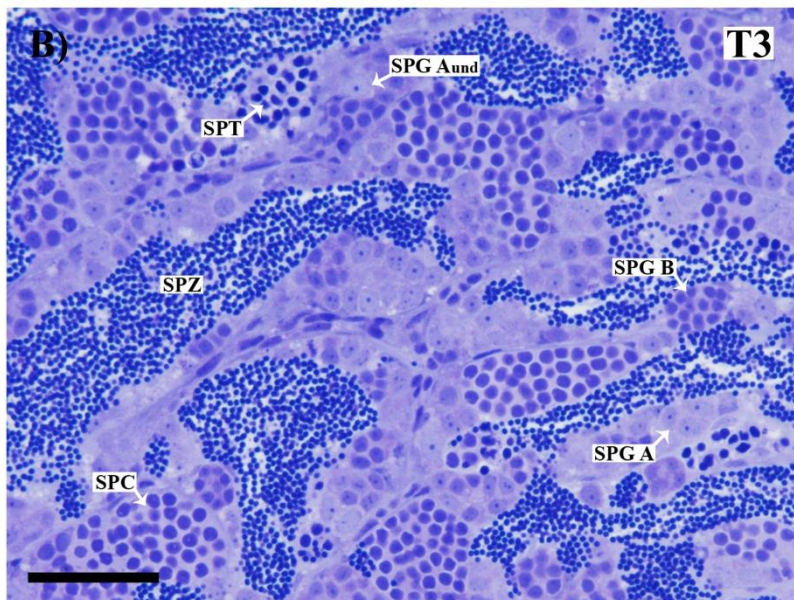
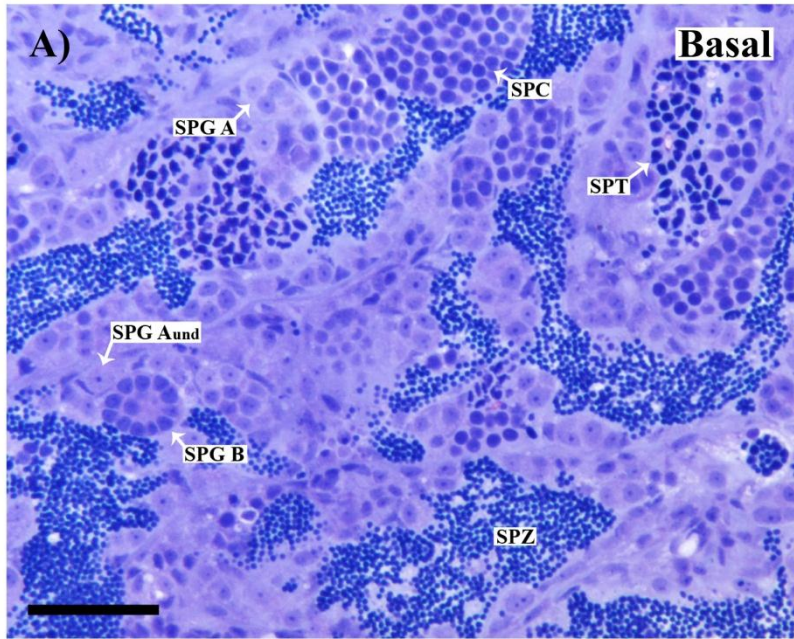


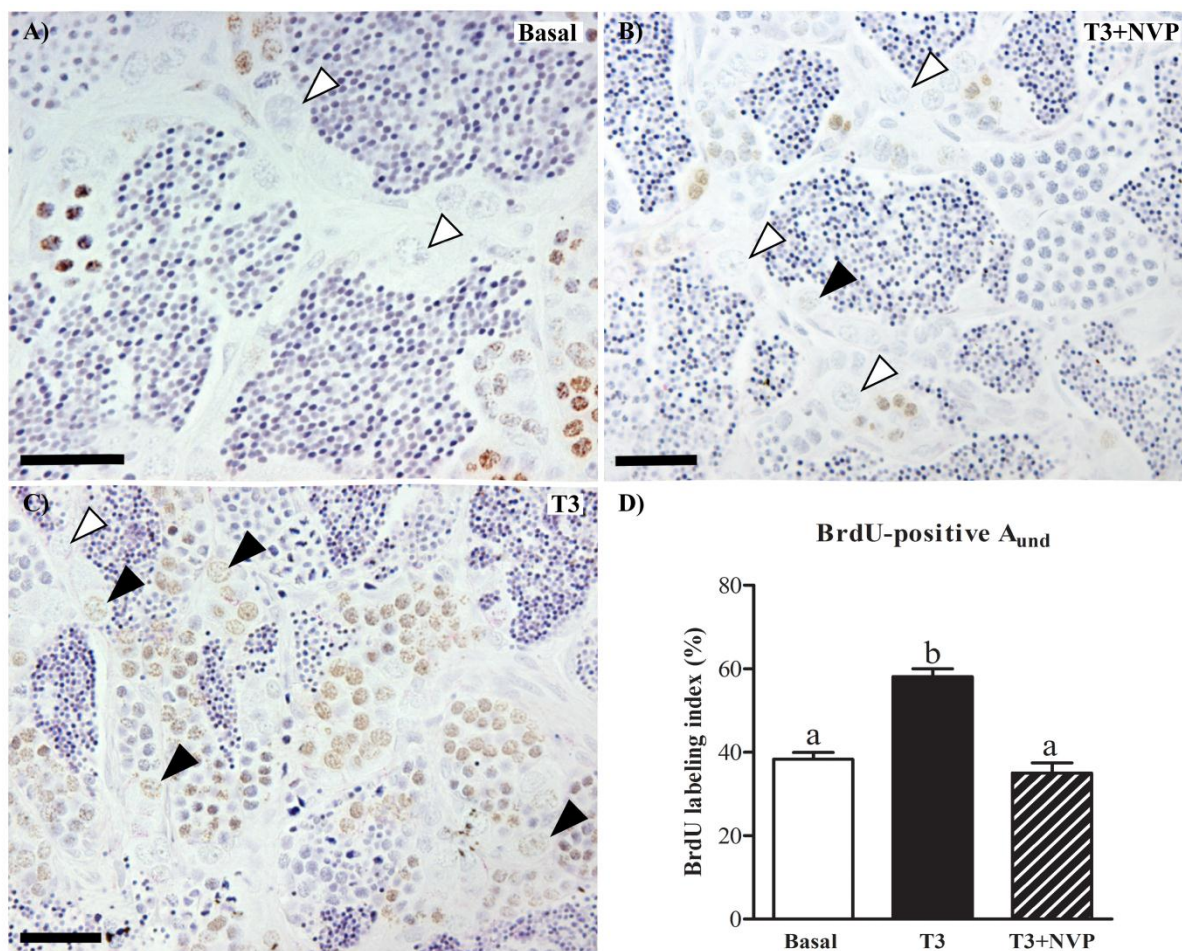
B)



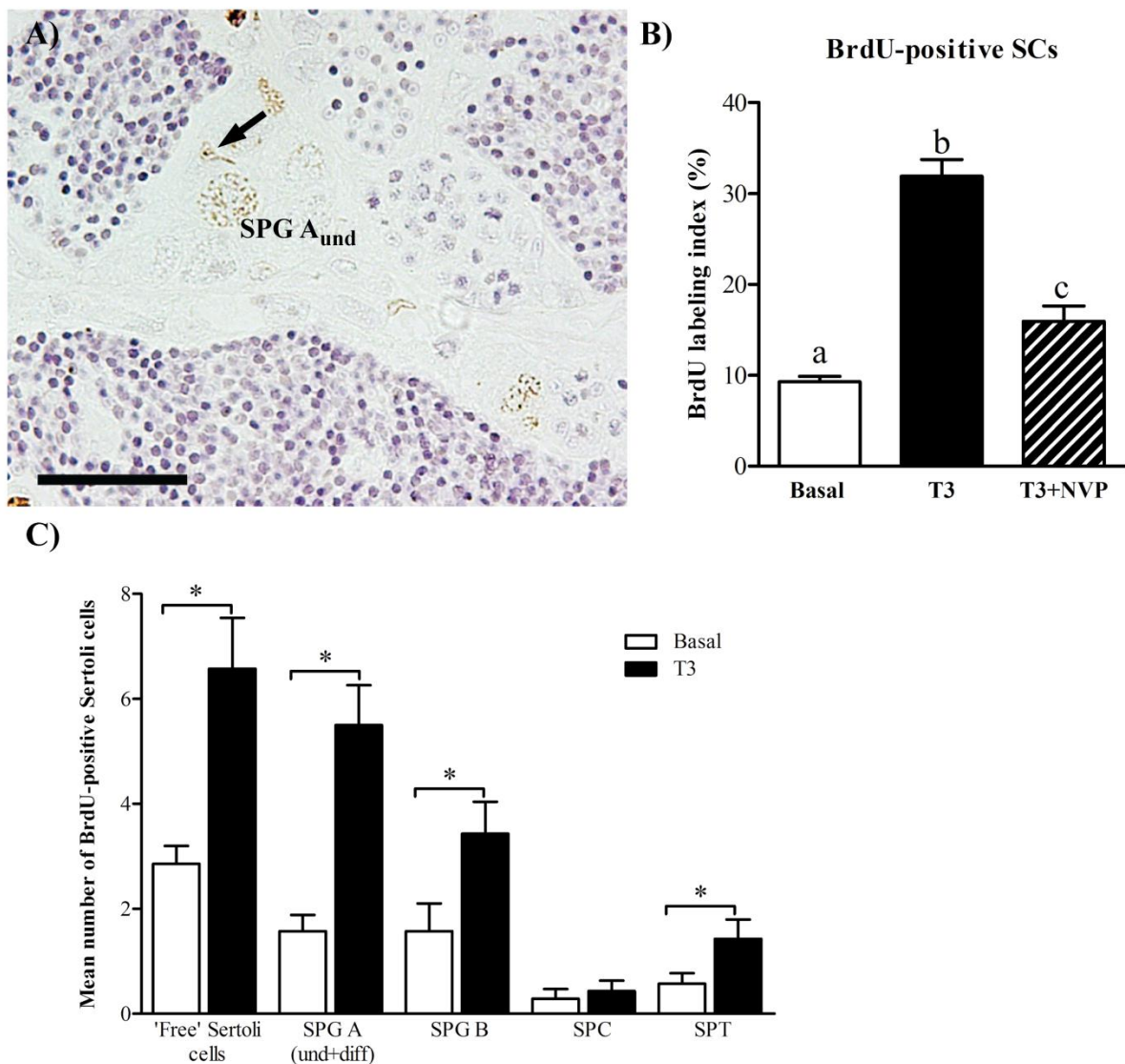
**Figura 3 – Liberação de andrógenos em explantes testiculares e análise da expressão gênica em testículos de zebrafish adultos. A)** Liberação de andrógenos 1 dia após incubação em condições basais, com 50 ng/mL de T<sub>3</sub>, ou após exposição a diferentes doses de T<sub>3</sub>, na presença ou ausência de 25 ng/mL de rzf Fsh. Os resultados estão apresentados como quantidade de 11-KT produzida em nanograma por mg de peso testicular. **B)** Níveis de RNAm testicular de *ar* e *cyp17a1* 1 dia após de exposição a diferentes doses de T<sub>3</sub>, sozinho ou em combinação com rzf Fsh. As colunas representam o quociente de equivalência entre os níveis relativos de RNAm do grupo tratado sobre o seu respectivo controle. O asterisco indica diferença significativa entre os grupos tratado e controle (p<0,05).

**Figura 4 – Análise morfológica dos testículos de zebrafish após 4 dias de cultura . A-B)** Secções histológicas de testículos de zebrafish coradas com azul de toluidina nas quais observa-se que a cito-arquitetura deste órgão apresenta-se normal, com ou sem exposição a 50 ng/mL de T<sub>3</sub>, e também com a presença de todos os tipos de células germinativas. **C)** Percentual dos diferentes tipos de cistos de células germinativas em testículos de zebrafish expostos ou não a 50 ng/mL de T<sub>3</sub>. SPG A<sub>und</sub>, espermatogônia do tipo A indiferenciada; SPG A<sub>diff</sub>, espermatogônia do tipo A diferenciada; SPG B, espermatogônia do tipo B; L/Z, espermátócito primário em leptóteno/zigóteno; P, espermátócito primário em paquíteno; D, espermátócito primário em diplóteno; SS, espermátócito secundário; SPT, espermátides; e SPZ, espermatozóides. Colunas marcadas com asteriscos denotam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratado e controla. Barra = 50  $\mu$ m.

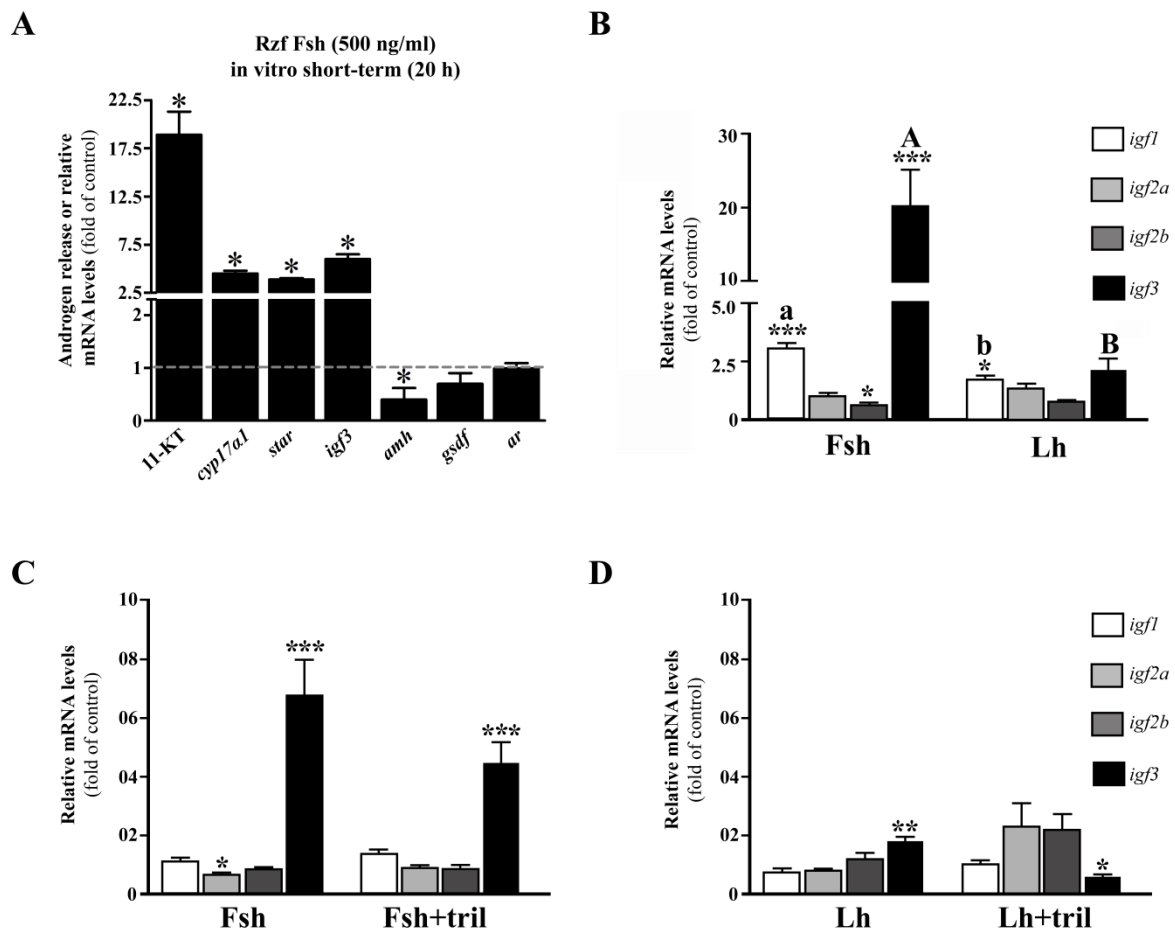




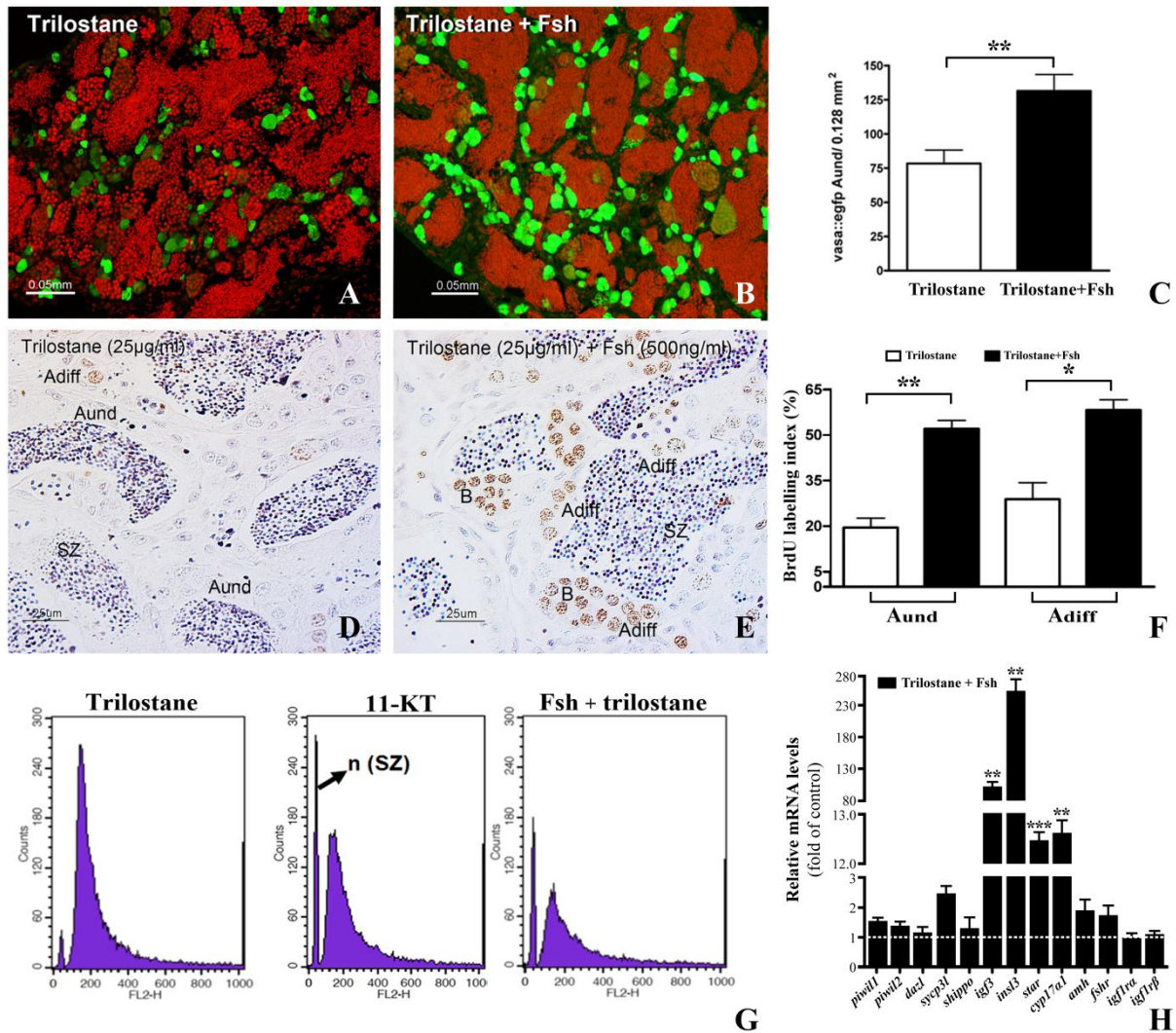
**Figura 5 – Localização e quantificação da incorporação de BrdU, durante as últimas 6 horas de incubação dos testículos de zebrafish, após 4 dias em cultura.** Secções histológicas mostrando imunodeteção para BrdU nos testículos incubados em meio basal/controle (A), na presença de 50 ng/mL de T<sub>3</sub> (B), ou em meio de cultura contendo 50 ng/mL de T<sub>3</sub> + 10 μM de NVP-AEW541 (inibidor de IGF-1R) (C). A cabeça de seta em preto indica espermatogônia do tipo A indiferenciada (A<sub>und</sub>) positiva para BrdU, enquanto a cabeça de seta em branco indica A<sub>und</sub> negativa para BrdU. D) Representação do índice de incorporação de BrdU de A<sub>und</sub> (% do número total de A<sub>und</sub> positivas para BrdU). Letras distintas indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as três condições de incubação investigadas. Barras = 25 μm.



**Figura 6 - Localização e quantificação da incorporação de BrdU, durante as últimas 6 horas de incubação, em explantes testiculares tratados com 50 ng/mL de T<sub>3</sub>, na ausência ou presença de 10 μM de NVP-AEW541 por 4 dias. A)** Núcleo de célula de Sertoli BrdU-positiva (seta) associada com espermatogônia do tipo A indiferenciada (A<sub>und</sub>) BrdU-positiva. **B)** Índice de incorporação de BrdU (% do número total de células) de células de Sertoli, onde letras distintas indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as diversas condições de tratamento. **C)** Tratamento com T<sub>3</sub> mostrando aumento no índice de célula de Sertoli BrdU-positiva associadas ou não (livres) com diferentes tipos de células germinativas. Espermatogônias do tipo A indiferenciada e diferenciada [SPG A (und+diff)]; espermatogônia do tipo B (SPG B); espermatócitos (SPC); espermatídes (SPT); e células de Sertoli aparentemente não associadas com células de germinativas ('Free' Sertoli cells). Letras distintas indicam diferenças significativas (p<0,05) entre as três condições de incubação investigadas. Barras = 30 μm.



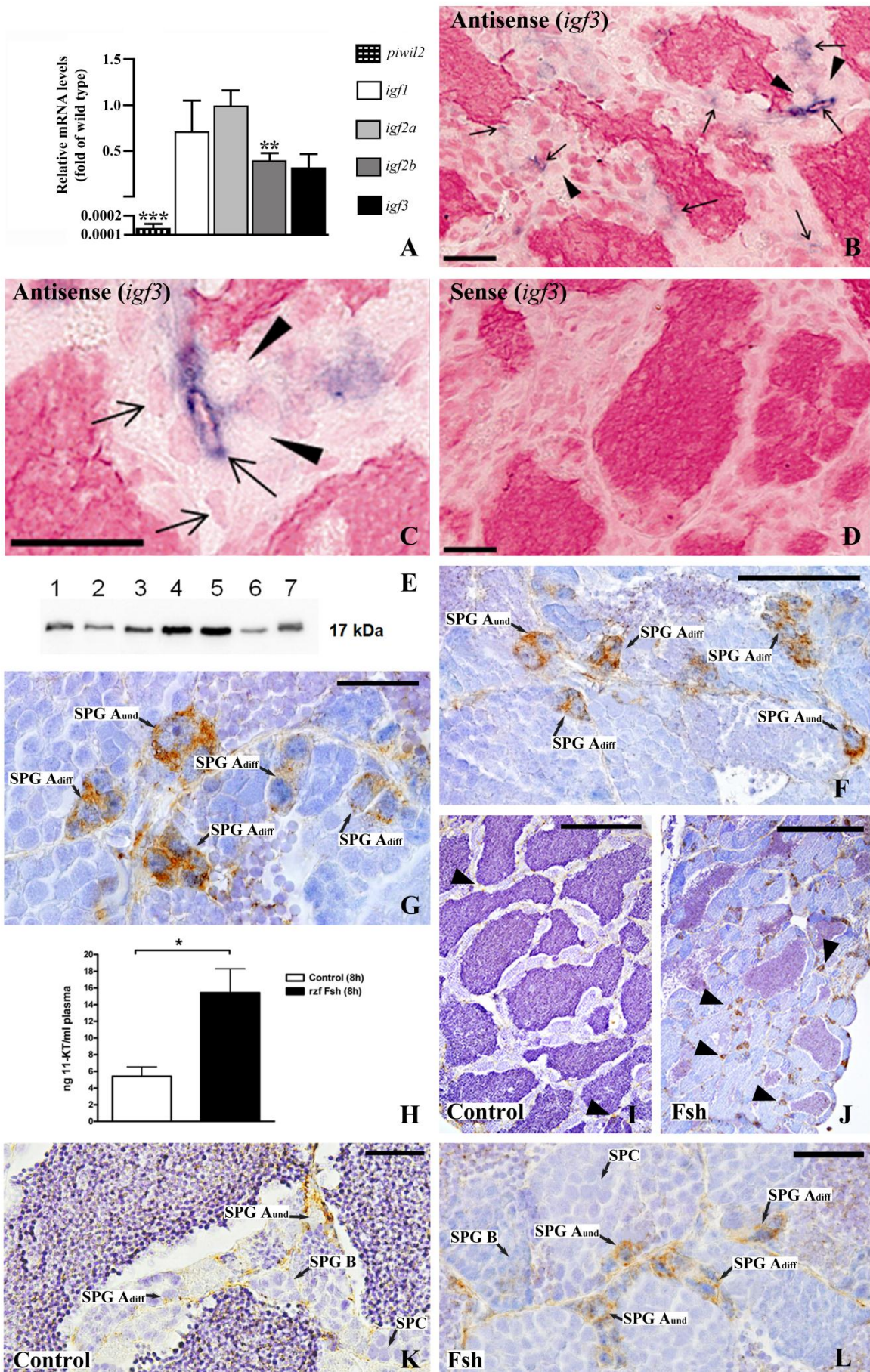
**Figura 7 – Liberação de andrógeno e análise da expressão de RNAm de genes selecionados sob a influência de gonadotropinas.** **A)** Liberação de andrógeno e níveis de RNAm de genes específicos de células de Sertoli e de Leydig em resposta à 500 ng/mL de rzf Fsh, após 20 horas de cultura. **B)** Perfil de expressão de genes da família Igf sob a influência das gonadotrofinas (rzf Fsh e Lh), após injeções intraperitoneais de 100 ng/g de peso corporal de cada gonadotrofina (n= 6-8 por tratamento). **C-D)** Estudo do perfil de expressão gênica de genes da família Igf, 2 dias após cultura, sob a influência de rzf Fsh (**C**) ou rzf Lh (**D**), na presença de 25 µg/mL de trilostano para bloqueio da liberação de andrógenos (n= 4-8 por tratamento). Todas as colunas representam o quociente de equivalência entre os níveis relativos de RNAm do grupo tratado sobre o seu respectivo controle. Os asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e tratado. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando as comparações foram feitas entre tratamentos (i.e. Fsh versus Lh).



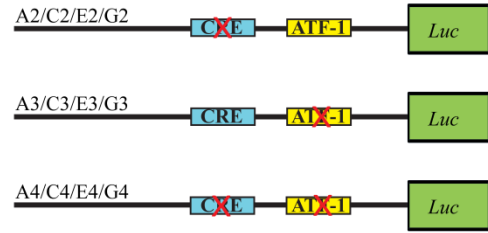
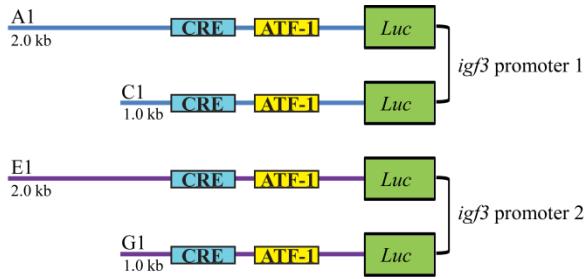
**Figura 8 – Efeitos do rzf Fsh na proliferação espermatogonial em testículos de zebrafish. A-C)** Análise morfológica do testículo e quantitativa da proliferação de espermatogônia do tipo A indiferenciada em testículos de zebrafish *vasa::egfp* tratados com 25 µg/mL de trilostano, na ausência ou presença de 500 ng/mL de rzf Fsh (n= 8). **D-F)** Análise morfológica do testículo e quantitativa da incorporação de BrdU por espermatogônias dos tipos A indiferenciada (A<sub>und</sub>) e diferenciada (A<sub>diff</sub>) em testículos de zebrafish, pré-tratados *in vivo* com estradiol (E2), e expostos em cultura por 7 dias com 25 µg/mL de trilostano, na ausência ou presença de 500 ng/mL de rzf Fsh (n= 8). **G)** Análise da proporção de células haplóides (espermátides/espermatozóides) através de citometria de fluxo, em suspensão celular obtida após explantes testiculares tratados por 7 dias com trilostano (controle), 11-KT ou Fsh+trilostano (n= 4). **H)** Análise da expressão gênica dos testículos de zebrafish, pré-tratados *in vivo* com E2, incubados com 25 µg/mL de trilostano, na ausência ou presença de 500 ng/mL de rzf Fsh (n= 8). As colunas em **H** representam o quociente de equivalência entre os níveis relativos de RNAm do grupo tratado sobre o seu respectivo controle, enquanto os asteriscos indicam diferenças significativas (p<0,05) entres os grupos controle e tratado.

**Figura 9 – Expressão gênica diferencial, localização testicular de RNAm de *igf3* por hibridização *in situ*, e da proteína Igf3 através de imunohistoquímica, em testículos de zebrafish. A)** Análise comparativa da expressão gênica entre testículos de zebrafish selvagem e mutante *pimil1*<sup>(-/-)</sup>. As colunas representam o quociente de equivalência entre os níveis relativos de RNAm dos peixes mutantes e dos selvagens, enquanto os asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes condições genéticas investigadas ( $n = 3$ ). **B-D)** Localização dos sítios de expressão testicular de RNAm de *igf3* (seta em preto) em testículos coletados após injeção intraperitoneal com rzf Fsh. A cabeça de seta indica núcleo de espermatogônias do tipo A. **E)** Western blot realizado para se determinar a especificidade do anticorpo produzido em testículos de zebrafish. **F-G)** Imunohistoquímica (IHC) para identificação testicular da proteína Igf3 nos testículos de zebrafish após injeção intraperitoneal com rzf Fsh. **H)** Níveis plasmáticos de 11-KT confirmando a atividade biológica da gonadotrofina utilizada (rzf Fsh). As colunas representam a quantidade de 11-KT produzida em nanograma por mg de peso testicular, enquanto o asterisco indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do grupo tratado comparado com o seu respectivo grupo controle. **I-L)** IHC para análise comparativa e qualitativa dos efeitos do rzf Fsh no recrutamento de células de Sertoli expressando Igf3 (cabeça de seta). SPG A<sub>und</sub>, espermatogônia do tipo A indiferenciada; SPG A<sub>diff</sub>, espermatogônia do tipo A diferenciada; SPG B, espermatogônia do tipo B; e SPC, espermátócito.



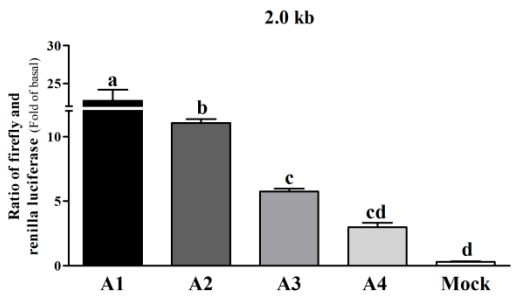


**Figura 10 – Estudo das regiões promotoras do gene *igf3* de zebrafish através da transfecções em células HEK 293T e expressão gênica de *igf3* em explantes testiculares tratados com inibidores das vias do cAMP. A)** Representações esquemáticas das regiões promotoras do *igf3* de zebrafish fusionadas com plasmídeos contendo o gene reporter da luciferase evidenciando-se os sítios de ligação de CRE e ATF-1 em suas versões selvagens (2.0 kb) e truncadas (1.0 kb). **B)** Representações esquemáticas das regiões promotoras do *igf3* de zebrafish, evidenciando-se os pontos de mutações, as quais foram realizadas para inativação dos sítios de ligação de CRE e ATF-1. **C-F)** Níveis de resposta do CRE e ATF-1 ao tratamento com 10  $\mu$ M de forskolina em células HEK 293T transfectadas com os diferentes plasmídeos utilizados: **A1-E1 e C1-G1**, versões selvagens das regiões promotoras com 2.0 e 1.0 kb, respectivamente; **A2, C2, E2 e G2**, versões mutadas para o sítio de ligação para CRE; **A3, C3, E3 e G3**, versões mutadas para o sítio de ligação para ATF-1; **A4, C4, E4 e G4**, versões mutadas para os sítios de ligação para CRE e ATF-1; Mock, células transfectadas com vetores pcDNA3 sem informação das regiões promotoras (controle positivo). As colunas em **C-F** representam o quociente de equivalência entre os grupos tratados e não tratados com a forskolina, enquanto os valores obtidos para a luciferase foram normalizados pelos níveis de TK-Renilla. Letras distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as diversas versões das regiões promotoras. **G)** Níveis relativos de RNAm de *igf3* em explantes testiculares tratados com rzf Fsh, na presença ou ausência do inibidor da PKA, H89 ou do inibidor da MAPK, PD98059. As colunas em **G** representam o quociente de equivalência entre os níveis relativos de RNAm do grupo tratado sobre os seus respectivos controles, enquanto o asterisco indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados.

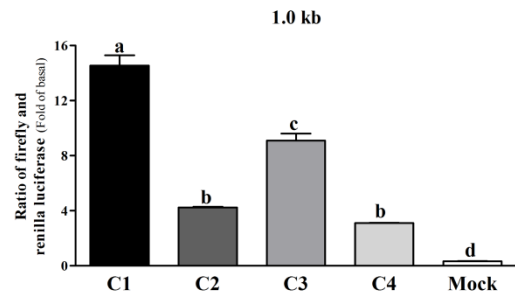


**A**

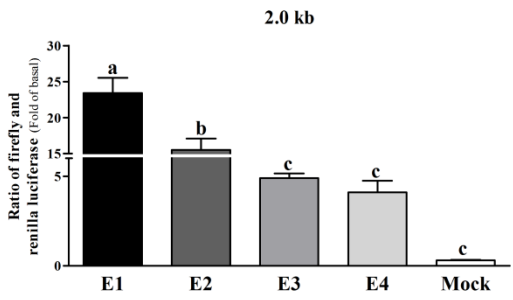
**B**



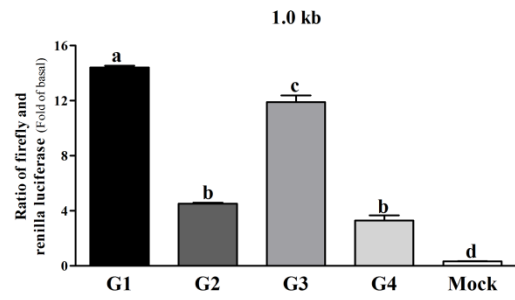
**C**



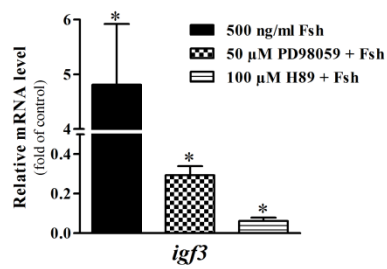
**D**



**E**

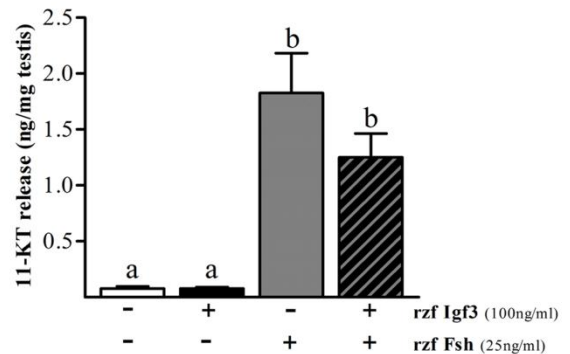
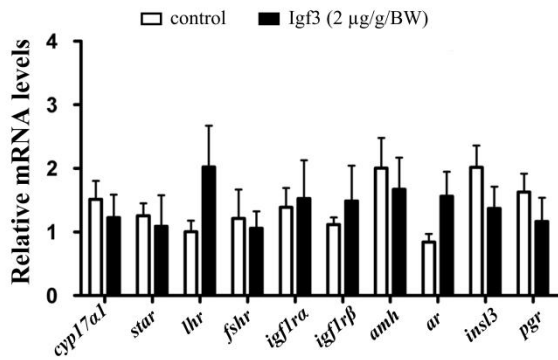
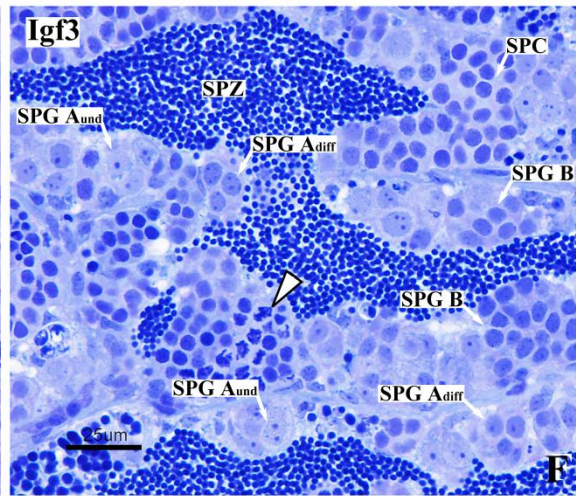
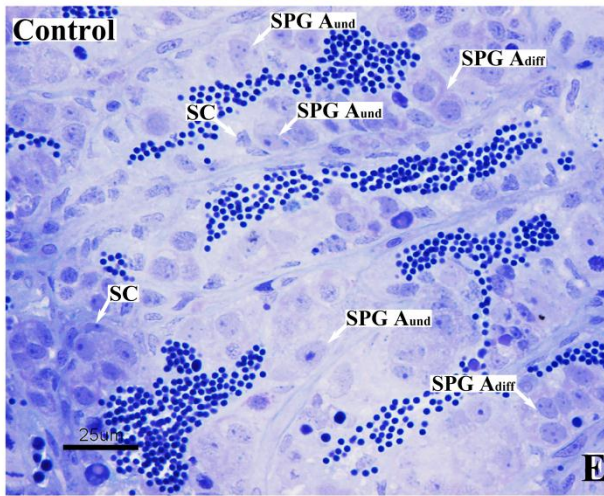
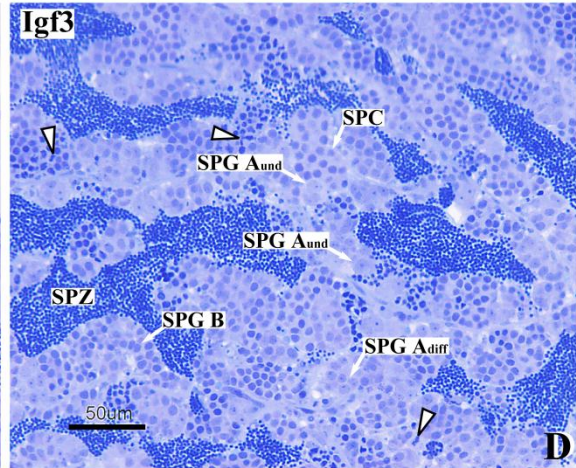
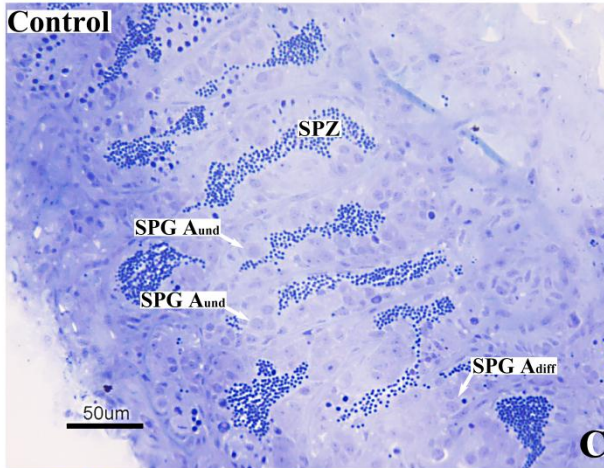
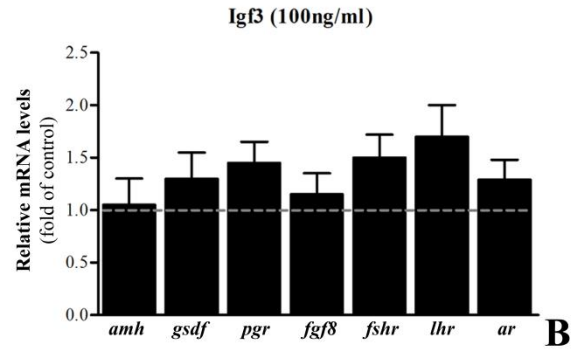
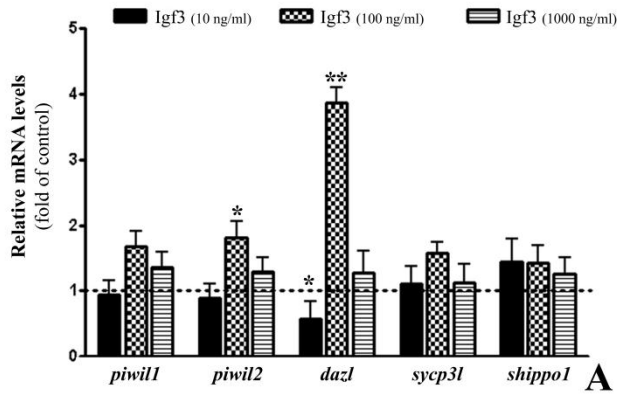


**F**



**G**

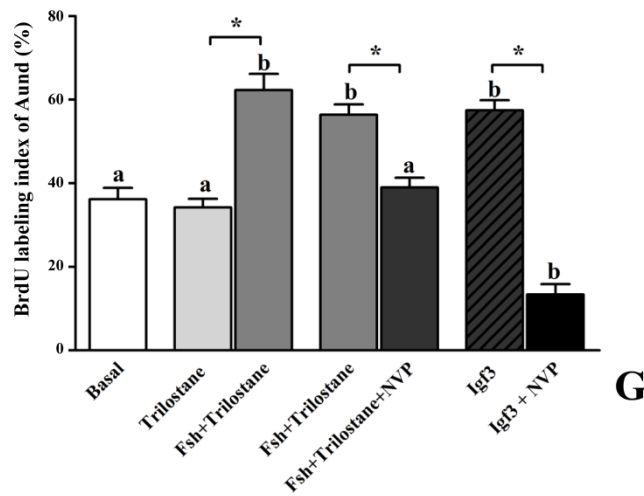
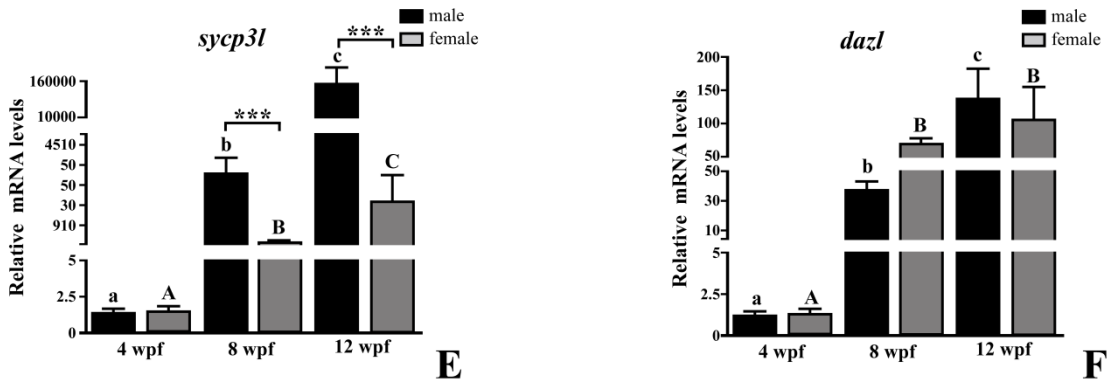
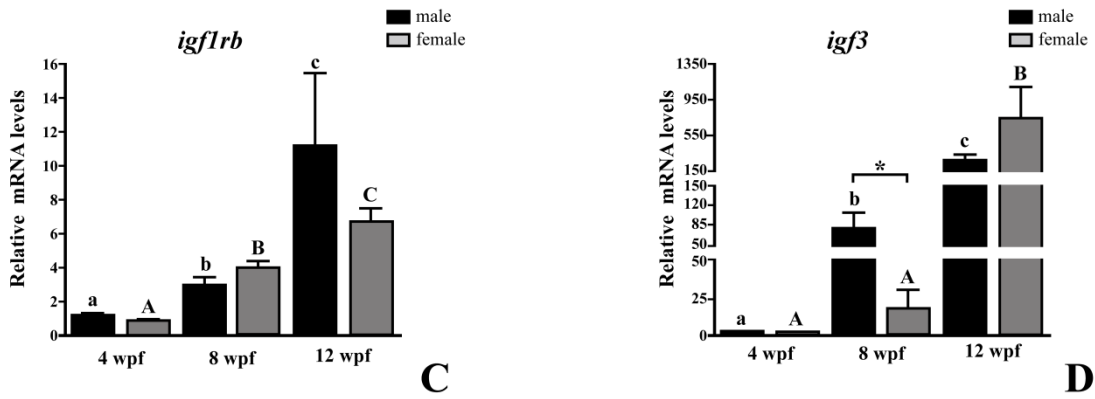
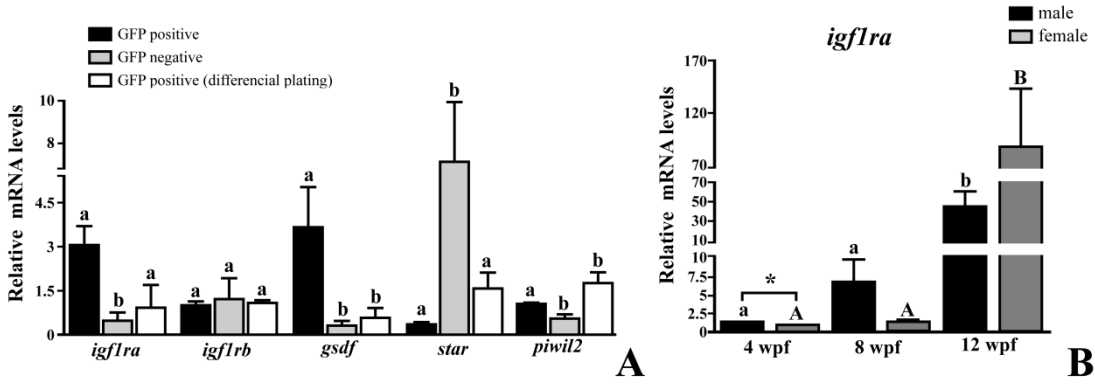
**Figura 11 – Efeitos do rzf Igf3 nos testículos de zebrafish *ex vivo* e *in vivo*.** **A)** Análise da expressão gênica dos testículos de zebrafish, pré-tratados *in vivo* com estradiol (E2) e expostos à diferentes doses de rzf Igf3, em cultura por 7 dias. **B)** Níveis relativos de RNAm de genes relacionados às células somáticas dos testículos de zebrafish, pré-tratados *in vivo* com E2 e expostos em cultura por 7 dias ao rzf Igf3. As colunas em **A** e **B** representam o quociente de equivalência entre os níveis relativos de RNAm do grupo tratado sobre os seus respectivos controles, enquanto os asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entres os diferentes grupos investigados. **C-F)** Análise morfológica dos testículos de zebrafish, 7 após cultura testicular na ausência (grupo controle) ou presença de rzf Igf3 (grupo tratado), onde observa-se a retomada do processo espermatogênico após a depleção decorrente do tratamento *in vivo* com E2. SC, células de Sertoli; SPG A<sub>und</sub>, espermatogônia do tipo A indiferenciada; SPG A<sub>diff</sub>, espermatogônia do tipo A diferenciada; SPG B, espermatogônia do tipo B; SPC, espermatócito; e SPZ, espermatozóides. **G)** Níveis relativos de RNAm de genes específicos de células somáticas do testículo de zebrafish, 2 horas após injeções intraperitoneais de rzf Igf3. **H)** Liberação de 11-KT pelos testículos de zebrafish tratados com rzf Igf3, na ausência ou presença de rzf Fsh, em cultura por 1 dia ( $n = 5$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entres as diversas condições de tratamento.

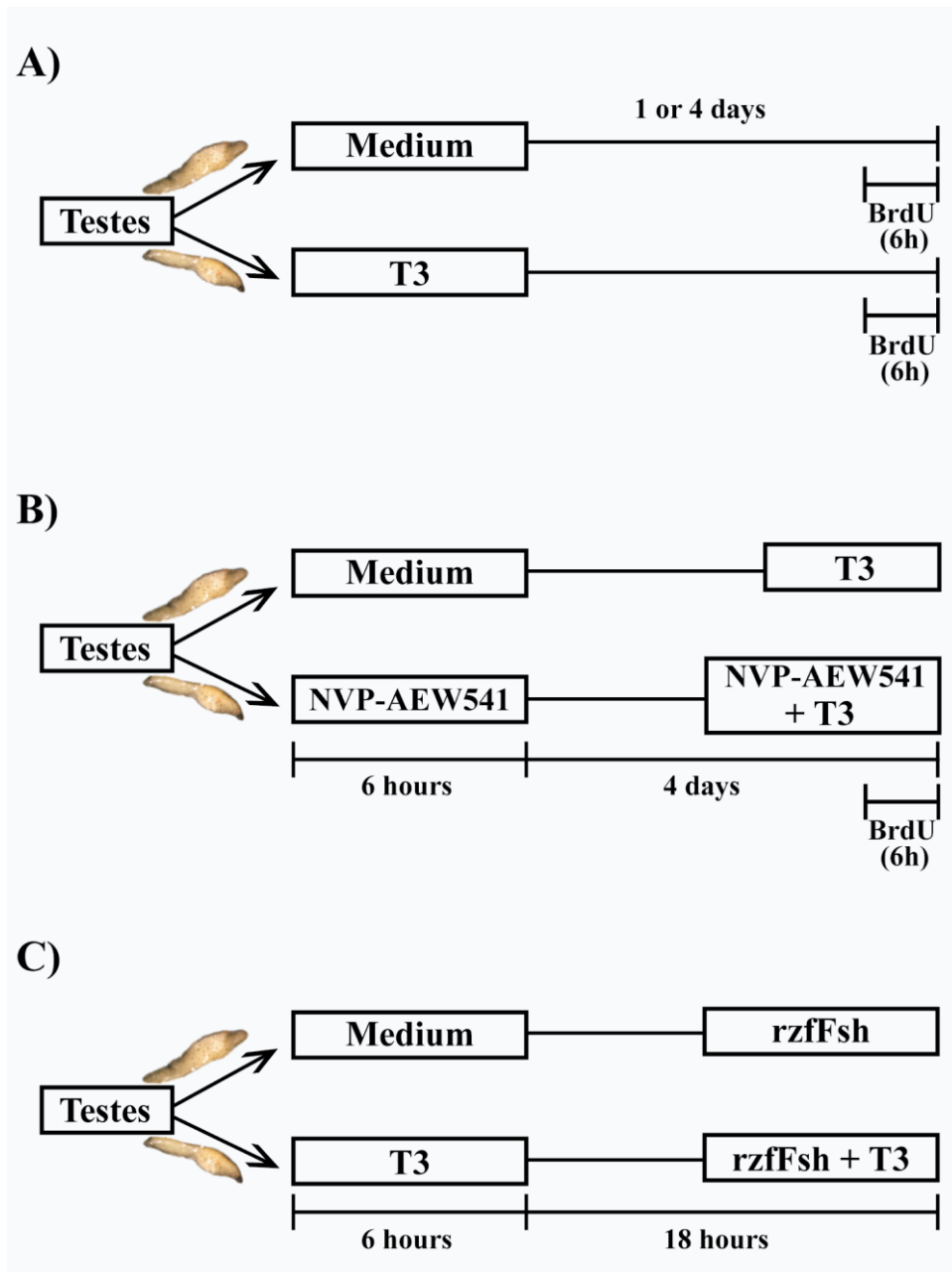


**G**

**H**

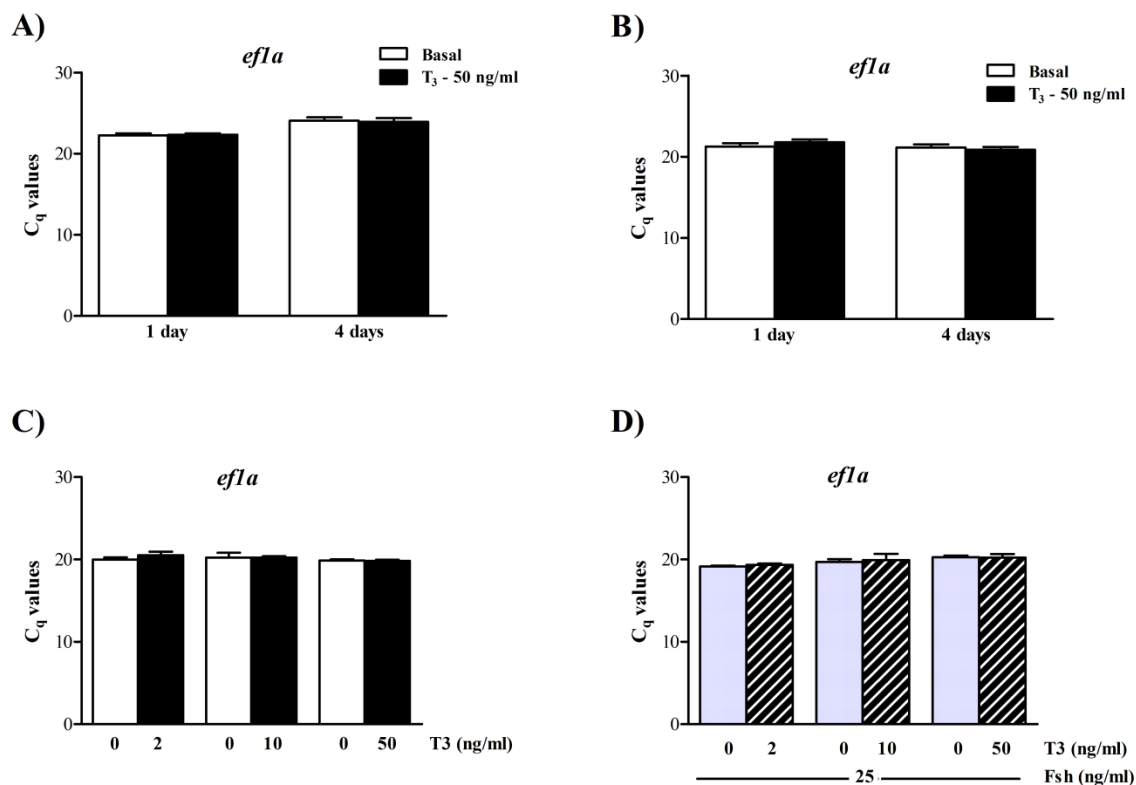
**Figura 12 – Análise da expressão gênica do testículo de zebrafish e índice de proliferação de espermatogônias. A)** Níveis relativos de RNAm dos receptores de Igf e de genes específicos de células de Sertoli (*gsdf*), Leydig (*star*) e germinativas (*piv12*), em suspensão celular de testículos de zebrafish adultos *vasa::egfp* (n = 2-4). A análise estatística foi feita tendo a primeira coluna como referência e letras diferentes denotam significância estatística ( $p < 0,05$ ). Níveis relativos de RNAm dos genes *igf1ra* (**B**), *igf1rb* (**C**), *igf3* (**D**), *sycp3l* (**E**) e *dazl* (**F**), durante a ontogênese da gônada de zebrafish machos e fêmeas (n = 6-8). **G** Índice de proliferação de espermatogônias do tipo A indiferenciadas ( $A_{und}$ ) avaliado através da incorporação com 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) em cultura de testículos de zebrafish adultos (n = 6-8), sob as seguintes condições experimentais: basal; trilostano; e rzf Fsh ou Igf3, na presença ou ausência de NVP-AEW541. A análise estatística (ANOVA) foi feita tendo a primeira coluna (basal) como referência e letras diferentes denotam significância estatística ( $p < 0,05$ ). Asterisco denota diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado ( $p < 0,05$ ). wfp = semanas pós-fertilização.





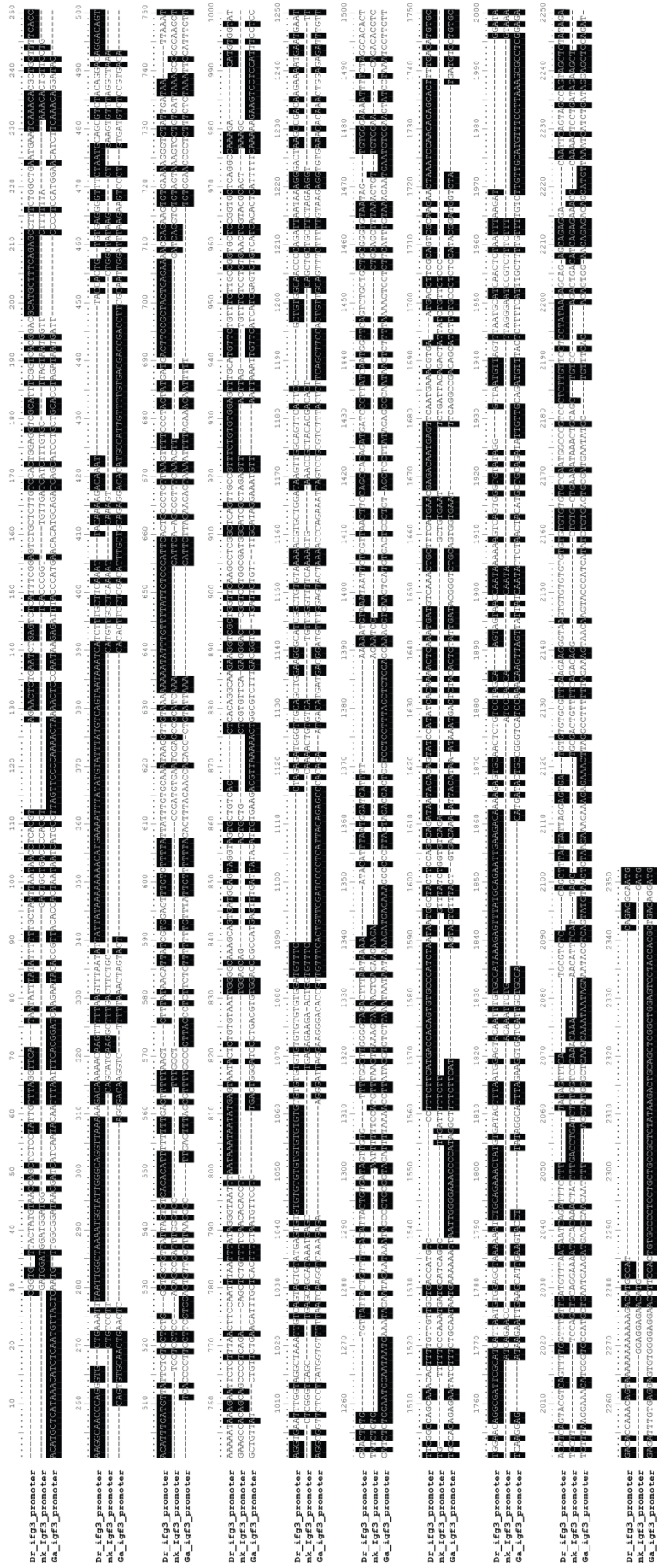
**Figura suplementar 1** – Desenho experimental (A-C) utilizado para se investigar os efeitos do T<sub>3</sub> em cultura de testículos de zebrafish. O meio de cultura dos grupos controle e tratado foi coletado 1 dia após cultivo para análise da liberação de andrógeno por radioimunoensaio. Um ou quatro dias pós-cultura os testículos foram coletados com a finalidade de se analisar a expressão gênica. Com o objetivo de se quantificar a proliferação celular, os explantes testiculares foram incubados nas últimas 6 h em meio de cultura contendo 50 ng/mL de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU). T<sub>3</sub>, triiodotironina; rzf Fsh, hormônio foliculo estimulante recombinante de zebrafish; NVP-AEW541 (inibidor de receptor de IGF-1).

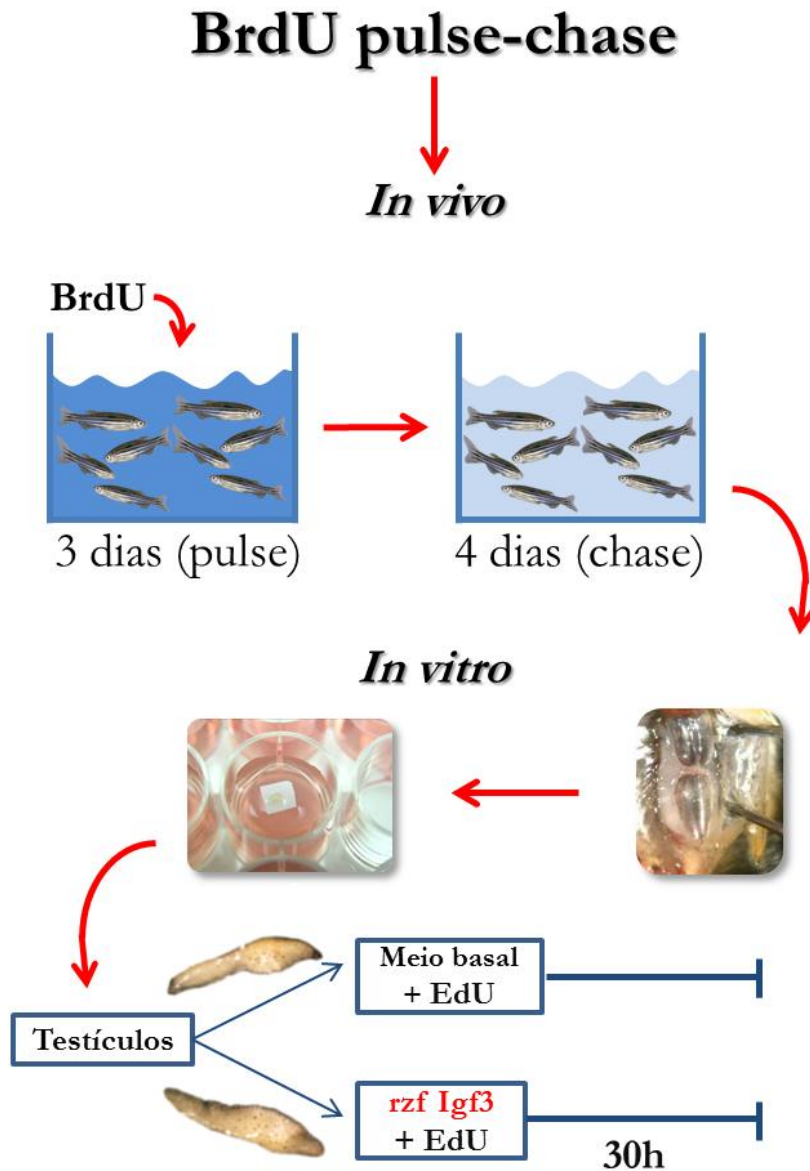




**Figura suplementar 2 – Expressão gênica (controle interno) dos experimentos *ex vivos*, 1 ou 4 dias pós-cultura.** **A)** Níveis de RNAm de fator de alongamento alfa 1 (*efla*) usados para normalizar os níveis de RNAm dos genes alvos investigados. **B)** Níveis de RNAm de *efla* usados para normalizar os níveis de RNAm de dois diferentes tipos de conexinas (*cx43* e *cx43.4*). Níveis de RNAm de *efla* usados para normalizar os níveis de RNAm de fator de crescimento semelhante a insulina 3 (*igf3*) (**C**), receptor de andrógeno (*ar*), e enzima esteroidogênica (*cyp17a1*) (**C-D**). Conforme esperado, nenhuma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos níveis de RNAm do gene controle (*efla*) foi observada nos diferentes experimentos.

**Figura suplementar 3** – Alinhamento das regiões promotoras putativas do fator de crescimento semelhante a insulina 3 (*igf3*) de diferentes espécies de peixes utilizados para a identificação de possíveis fatores de transcrição conservados evolutivamente. Após alinhamento, foram identificados motivos para o elemento responsivo ao AMP-cíclico (CRE) e para o fator de transcrição dependente de AMP-cíclico 1 (ATF-1). **Dr**, *Danio rerio*; **Mk**, *Oryzias latipes* e **Ga**, *Gasterosteus aculeatus*.





**Figura suplementar 4** – Desenho experimental ilustrativo utilizado para se investigar os efeitos do Igf3 na auto-renovação de espermatogônias do tipo  $A_{und}$  em testículos de zebrafish. Trinta horas pós-cultura os testículos serão coletados com a finalidade de se analisar a incorporação de BrdU (*in vivo*) e EdU (*in vitro*) através de imunofluorescência. BrdU, 5-bromo-2-deoxiuridina; EdU, 5-etinil-2'-deoxiuridina; rzf Igf3, fator de crescimento semelhante à insulina 3 recombinante de zebrafish.

## **9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9- Referências Bibliográficas

---

- Abel, M.H., Baban, D., Lee, S., Charlton, H.M. & O'Shaughnessy, P.J. (2009). Effects of FSH on testicular mRNA transcript levels in the hypogonadal mouse. *J Mol Endocrinol*, Vol. 42, No. 4, pp. 291-303.
- Abel, M.H., Baker, P.J., Charlton, H.M., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K., Guillou, F. & O'Shaughnessy, P.J. (2008). Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology*, Vol. 149, No. 7, pp. 3279-85.
- Abel, M.H., Wootton, A.N., Wilkins, V., Huhtaniemi, I., Knight, P.G. & Charlton, H.M. (2000). The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*, Vol. 141, No. 5, pp. 1795-803.
- Almeida, F.F., Kristoffersen, C., Taranger, G.L. & Schulz, R.W. (2008). Spermatogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua*): a novel model of cystic germ cell development. *Biol Reprod*, Vol. 78, No. 1, pp. 27-34.
- Ando, H. & Mishina, M. (2000). [Mutagenesis in zebrafish]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, Vol. 45, No. 17 Suppl, pp. 2829-37.
- Antich, M., Fabian, E., Sarquella, J. & Bassas, L. (1995). Effect of testicular damage induced by cryptorchidism on insulin-like growth factor I receptors in rat Sertoli cells. *J Reprod Fertil*, Vol. 104, No. 2, pp. 267-75.
- Antony, F.F., Aruldas, M.M., Udhayakumar, R.C., Maran, R.R. & Govindarajulu, P. (1995). Inhibition of Leydig cell activity in vivo and in vitro in hypothyroid rats. *J Endocrinol*, Vol. 144, No. 2, pp. 293-300.
- Arambepola, N.K., Bunick, D. & Cooke, P.S. (1998a). Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate Mullerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *Endocrinology*, Vol. 139, No. 11, pp. 4489-95.
- Arambepola, N.K., Bunick, D. & Cooke, P.S. (1998b). Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. *J Endocrinol*, Vol. 156, No. 1, pp. 43-50.
- Ariyaratne, H.B., Mills, N., Mason, J.I. & Mendis-Handagama, S.M. (2000). Effects of thyroid hormone on Leydig cell regeneration in the adult rat following ethane dimethane sulphonate treatment. *Biol Reprod*, Vol. 63, No. 4, pp. 1115-23.
- Auharek, S.A. & de Franca, L.R. (2010). 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*, Vol. 216, No. 5, pp. 577-88.
- Auharek, S.A., de Franca, L.R., McKinnell, C., Jobling, M.S., Scott, H.M. & Sharpe, R.M. (2010). Prenatal plus postnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. *Endocrinology*, Vol. 151, No. 6, pp. 2868-75.
- Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J. & Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, Vol. 75, No. 1, pp. 73-82.
- Batlouni, S.R., Nobrega, R.H. & Franca, L.R. (2009). Cell junctions in fish seminiferous epithelium. *Fish Physiol Biochem*, Vol. 35, No. 1, pp. 207-17.
- Berishvili, G., Baroiller, J.F., Eppler, E. & Reinecke, M. (2010). Insulin-like growth factor-3 (IGF-3) in male and female gonads of the tilapia: development and regulation of gene expression by growth hormone (GH) and 17alpha-ethinylestradiol (EE2). *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 167, No. 1, pp. 128-34.

- Bogerd, J., Blomenrohr, M., Andersson, E., van der Putten, H.H., Tensen, C.P., Vischer, H.F., Granneman, J.C., Janssen-Dommerholt, C., Goos, H.J. & Schulz, R.W. (2001). Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod*, Vol. 64, No. 6, pp. 1633-43.
- Brehm, R., Zeiler, M., Ruttinger, C., Herde, K., Kibschull, M., Winterhager, E., Willecke, K., Guillou, F., Lecureuil, C., Steger, K., Konrad, L., Biermann, K., Failing, K. & Bergmann, M. (2007). A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol*, Vol. 171, No. 1, pp. 19-31.
- Buageaw, A., Sukhwani, M., Ben-Yehudah, A., Ehmcke, J., Rawe, V.Y., Pholpramool, C., Orwig, K.E. & Schlatt, S. (2005). GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol Reprod*, Vol. 73, No. 5, pp. 1011-6.
- Buzzard, J.J., Morrison, J.R., O'Bryan, M.K., Song, Q. & Wreford, N.G. (2000). Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod*, Vol. 62, No. 3, pp. 664-9.
- Cailleau, J., Vermeire, S. & Verhoeven, G. (1990). Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol*, Vol. 69, No. 1, pp. 79-89.
- Campbell, B., Dickey, J.T. & Swanson, P. (2003). Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biol Reprod*, Vol. 69, No. 6, pp. 2109-17.
- Canale, D., Agostini, M., Giorgilli, G., Caglieresi, C., Scartabelli, G., Nardini, V., Jannini, E.A., Martino, E., Pinchera, A. & Macchia, E. (2001). Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. *J Androl*, Vol. 22, No. 2, pp. 284-8.
- Catalano, S., Pezzi, V., Chimento, A., Giordano, C., Carpino, A., Young, M., McPhaul, M.J. & Ando, S. (2003). Triiodothyronine decreases the activity of the proximal promoter (PII) of the aromatase gene in the mouse Sertoli cell line, TM4. *Mol Endocrinol*, Vol. 17, No. 5, pp. 923-34.
- Chen, S. & Kimelman, D. (2000). The role of the yolk syncytial layer in germ layer patterning in zebrafish. *Development*, Vol. 127, No. 21, pp. 4681-9.
- Chen, S.X., Almeida, F.F., Andersson, E., Taranger, G.L., Schmidt, R., Schulz, R.W. & Bogerd, J. (2012). Cloning, pharmacological characterization and expression analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) nuclear progesterone receptor. *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 179, No. 1, pp. 71-7.
- Chen, S.X., Bogerd, J., Schoonen, N.E., Martijn, J., de Waal, P.P. & Schulz, R.W. (2013). A progestin (17alpha,20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 185, pp. 1-9.
- Cooke, P.S. (1991). Thyroid hormones and testis development: a model system for increasing testis growth and sperm production. *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 637, pp. 122-32.
- Cooke, P.S., Hess, R.A., Porcelli, J. & Meisami, E. (1991). Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology*, Vol. 129, No. 1, pp. 244-8.
- Cooke, P.S., Holsberger, D.R. & de Franca, L.R. (2005). Thyroid hormone regulation of Sertoli cell development In: Skinner MK, Griswold MD, eds *The Sertoli Cell Biology* Elsevier; 217-226.
- Cooke, P.S., Zhao, Y.D. & Bunick, D. (1994). Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod*, Vol. 51, No. 5, pp. 1000-5.
- Cyr, D.G. & Eales, J.G. (1988). In vitro effects of thyroid hormones on gonadotropin-induced estradiol-17 beta secretion by ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 69, No. 1, pp. 80-7.

- Czech, M.P. (1989). Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell*, Vol. 59, No. 2, pp. 235-8.
- De Franca, L.R., Hess, R.A., Cooke, P.S. & Russell, L.D. (1995). Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec*, Vol. 242, No. 1, pp. 57-69.
- De Gendt, K., McKinnell, C., Willems, A., Saunders, P.T., Sharpe, R.M., Atanassova, N., Swinnen, J.V. & Verhoeven, G. (2009). Organotypic cultures of prepubertal mouse testes: a method to study androgen action in sertoli cells while preserving their natural environment. *Biol Reprod*, Vol. 81, No. 6, pp. 1083-92.
- de Montgolfier, B., Dufresne, J., Letourneau, M., Nagler, J.J., Fournier, A., Audet, C. & Cyr, D.G. (2007). The expression of multiple connexins throughout spermatogenesis in the rainbow trout testis suggests a role for complex intercellular communication. *Biol Reprod*, Vol. 76, No. 1, pp. 2-8.
- de Montgolfier, B., Faye, A., Audet, C. & Cyr, D.G. (2009). Seasonal variations in testicular connexin levels and their regulation in the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 162, No. 3, pp. 276-85.
- de Rooij, D.G. & Griswold, M.D. (2012). Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J Androl*, Vol. 33, No. 6, pp. 1085-95.
- de Rooij, D.G. & Grootegoed, J.A. (1998). Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 10, No. 6, pp. 694-701.
- de Waal P. (2009). Hormonal Regulation Of Spermatogenesis in Zebrafish [PhD thesis]. ISSN 978.90.393.5143.7:105–131.
- de Waal, P.P., Leal, M.C., Garcia-Lopez, A., Liarte, S., de Jonge, H., Hinfray, N., Brion, F., Schulz, R.W. & Bogerd, J. (2009). Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis. *J Endocrinol*, Vol. 202, No. 2, pp. 287-97.
- de Waal, P.P., Wang, D.S., Nijenhuis, W.A., Schulz, R.W. & Bogerd, J. (2008). Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (*Danio rerio*) testis. *Reproduction*, Vol. 136, No. 2, pp. 225-34.
- Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M. & Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 95, No. 23, pp. 13612-7.
- Eddy, E.M. (1999). Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod*, Vol. 4, No. 1, pp. 23-30.
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A. & Parichy, D.M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, Vol. 4, No. 1, pp. 21-40.
- Feitsma, H., Leal, M.C., Moens, P.B., Cuppen, E. & Schulz, R.W. (2007). Mlh1 deficiency in zebrafish results in male sterility and aneuploid as well as triploid progeny in females. *Genetics*, Vol. 175, No. 4, pp. 1561-9.
- Flood, D.E., Fernandino, J.I. & Langlois, V.S. (2013). Thyroid hormones in male reproductive development: Evidence for direct crosstalk between the androgen and thyroid hormone axes. *Gen Comp Endocrinol*.
- Froment, P., Vigier, M., Negre, D., Fontaine, I., Beghelli, J., Cosset, F.L., Holzenberger, M. & Durand, P. (2007). Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. *J Endocrinol*, Vol. 194, No. 3, pp. 557-68.
- Garcia-Lopez, A., de Jonge, H., Nobrega, R.H., de Waal, P.P., van Dijk, W., Hemrika, W., Taranger, G.L., Bogerd, J. & Schulz, R.W. (2010). Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins. *Endocrinology*, Vol. 151, No. 5, pp. 2349-60.



- Gilleron, J., Nebout, M., Scarabelli, L., Senegas-Balas, F., Palmero, S., Segretain, D. & Pointis, G. (2006). A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol*, Vol. 209, No. 1, pp. 153-61.
- Grunwald, D.J. & Eisen, J.S. (2002). Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet*, Vol. 3, No. 9, pp. 717-24.
- Habibi, H.R., Nelson, E.R. & Allan, E.R. (2012). New insights into thyroid hormone function and modulation of reproduction in goldfish. *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 175, No. 1, pp. 19-26.
- Halm, S., Rocha, A., Miura, T., Prat, F. & Zanuy, S. (2007). Anti-Mullerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms. *Gene*, Vol. 388, No. 1-2, pp. 148-58.
- He, Z., Jiang, J., Kokkinaki, M., Golestaneh, N., Hofmann, M.C. & Dym, M. (2008). Gdnf upregulates c-Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation. *Stem Cells*, Vol. 26, No. 1, pp. 266-78.
- Hinfray, N., Nobrega, R.H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Marechal, E., Chadili, E., Palluel, O., Porcher, J.M., Schulz, R. & Brion, F. (2013). Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol. *J Endocrinol*, Vol. 216, No. 3, pp. 375-88.
- Hofmann, M.C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol*, Vol. 288, No. 1-2, pp. 95-103.
- Holsberger, D.R. & Cooke, P.S. (2005). Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res*, Vol. 322, No. 1, pp. 133-40.
- Holsberger, D.R., Kiesewetter, S.E. & Cooke, P.S. (2005). Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha1. *Biol Reprod*, Vol. 73, No. 3, pp. 396-403.
- Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., Plasterk, R.H., Hannon, G.J., Draper, B.W. & Ketting, R.F. (2007). A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*, Vol. 129, No. 1, pp. 69-82.
- Huhtaniemi, I. (2006). Mutations along the pituitary-gonadal axis affecting sexual maturation: novel information from transgenic and knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*, Vol. 254-255, pp. 84-90.
- Irwin, D.A. & Van Der Kraak, G. (2012). Regulation and actions of insulin-like growth factors in the ovary of zebrafish (*Danio rerio*). *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 177, No. 1, pp. 187-94.
- Jijiwa, M., Kawai, K., Fukihara, J., Nakamura, A., Hasegawa, M., Suzuki, C., Sato, T., Enomoto, A., Asai, N., Murakumo, Y. & Takahashi, M. (2008). GDNF-mediated signaling via RET tyrosine 1062 is essential for maintenance of spermatogonial stem cells. *Genes Cells*, Vol. 13, No. 4, pp. 365-74.
- Johnston, D.S., Olivas, E., DiCandeloro, P. & Wright, W.W. (2011). Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: a possible regulator of the replication and differentiation of stem spermatogonia. *Biol Reprod*, Vol. 85, No. 4, pp. 763-9.
- Joyce, K.L., Porcelli, J. & Cooke, P.S. (1993). Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *J Androl*, Vol. 14, No. 6, pp. 448-55.
- Kimmel, C.B. (1989). Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet*, Vol. 5, No. 8, pp. 283-8.
- Kimmel, C.B., Warga, R.M. & Schilling, T.F. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development*, Vol. 108, No. 4, pp. 581-94.

- Kokkinaki, M., Lee, T.L., He, Z., Jiang, J., Golestaneh, N., Hofmann, M.C., Chan, W.Y. & Dym, M. (2009). The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod*, Vol. 80, No. 4, pp. 707-17.
- Krovel, A.V. & Olsen, L.C. (2002). Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mech Dev*, Vol. 116, No. 1-2, pp. 141-50.
- Kumar, T.R. (2005). What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? *Reproduction*, Vol. 130, No. 3, pp. 293-302.
- Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N. & Matzuk, M.M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*, Vol. 15, No. 2, pp. 201-4.
- Lacerda, S.M., Costa, G.M., Araújo, M., Campos-Junior, P.H.A., Segatelli, T.M., Peixoto, M.T.D., Resende, R.R. & Franca, L.R. (2013). Phenotypic characterization and in vitro propagation and transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *Gen Comp Endocrinol*. Doi:10.1016/j.ygcen.2013.06.013
- Laslett, A.L., Li, L.H., Jester, W.F., Jr. & Orth, J.M. (2000). Thyroid hormone down-regulates neural cell adhesion molecule expression and affects attachment of gonocytes in Sertoli cell-gonocyte cocultures. *Endocrinology*, Vol. 141, No. 5, pp. 1633-41.
- Le Gac, F., Loir, M., le Bail, P.Y. & Ollitrault, M. (1996). Insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol Reprod Dev*, Vol. 44, No. 1, pp. 23-35.
- Le Gac, F.; Loir, M. (1999). Male reproductive system, fish. In: KNOBIL, E. & NEILL, J. D. (Eds.). Encyclopedia of Reproduction. San Diego: Academic Press, v. 3, p. 20-30.
- Leal, M.C., Cardoso, E.R., Nobrega, R.H., Batlouni, S.R., Bogerd, J., Franca, L.R. & Schulz, R.W. (2009a). Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biol Reprod*, Vol. 81, No. 1, pp. 177-87.
- Leal, M.C., de Waal, P.P., Garcia-Lopez, A., Chen, S.X., Bogerd, J. & Schulz, R.W. (2009b). Zebrafish primary testis tissue culture: an approach to study testis function ex vivo. *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 162, No. 2, pp. 134-8.
- Li, J., Liu, Z., Wang, D. & Cheng, C.H. Insulin-like growth factor 3 is involved in oocyte maturation in zebrafish. *Biol Reprod*, Vol. 84, No. 3, pp. 476-86.
- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J. & Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, Vol. 75, No. 1, pp. 59-72.
- Loir, M. (1994). In vitro approach to the control of spermatogonia proliferation in the trout. *Mol Cell Endocrinol*, Vol. 102, No. 1-2, pp. 141-50.
- Loir, M. (1999). Spermatogonia of rainbow trout: III. In vitro study of the proliferative response to extracellular ATP and adenosine. *Mol Reprod Dev*, Vol. 53, No. 4, pp. 443-50.
- Louvi, A., Accili, D. & Efstratiadis, A. (1997). Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol*, Vol. 189, No. 1, pp. 33-48.
- Marlatt, V.L., Gerrie, E., Wiens, S., Jackson, F., Moon, T.W. & Trudeau, V.L. (2011). Estradiol and triiodothyronine differentially modulate reproductive and thyroidal genes in male goldfish. *Fish Physiol Biochem*.
- Matta, S.L., Vilela, D.A., Godinho, H.P. & Franca, L.R. (2002). The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology*, Vol. 143, No. 3, pp. 970-8.
- McGonnell, I.M. & Fowkes, R.C. (2006). Fishing for gene function--endocrine modelling in the zebrafish. *J Endocrinol*, Vol. 189, No. 3, pp. 425-39.

- Mendis-Handagama, S.M. & Siril Ariyaratne, H.B. (2005). Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. *Indian J Exp Biol*, Vol. 43, No. 11, pp. 939-62.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M. & Sariola, H. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, Vol. 287, No. 5457, pp. 1489-93.
- Morais, R.D., Nobrega, R.H., Gomez-Gonzalez, N.E., Schmidt, R., Bogerd, J., Franca, L.R. & Schulz, R.W. (2013). Thyroid Hormone Stimulates the Proliferation of Sertoli Cells and Single Type A Spermatogonia in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Testis. *Endocrinology*.
- Moyle, P.B.; Cech Jr, J.J. (1996). *Fishes: An Introduction to Ichthyology*. Third Edition.
- Nader, M.R., Miura, T., Ando, N., Miura, C. & Yamauchi, K. (1999). Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro. *Biol Reprod*, Vol. 61, No. 4, pp. 944-7.
- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. In: *Fish Physiology*. Hoar, W.S.; Randall, D. J.; Donaldson, E. M. (Eds.). New York: Academic Press., v. IX, cap. 6.
- Nagano, M., Ryu, B.Y., Brinster, C.J., Avarbock, M.R. & Brinster, R.L. (2003). Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol Reprod*, Vol. 68, No. 6, pp. 2207-14.
- Nakae, J., Kido, Y. & Accili, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev*, Vol. 22, No. 6, pp. 818-35.
- Nakamura, S., Watakabe, I., Nishimura, T., Toyoda, A., Taniguchi, Y. & Tanaka, M. (2012). Analysis of medaka sox9 orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance. *PLoS One*, Vol. 7, No. 1, pp. e29982.
- Nakatani, K.; Agostinho, A. A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P.V.; Makrakis, M. C.; Pavanelli, C. S. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: EDUEM.
- Nelson, J. S. (1994). *Fishes of the world*, 3th ed., New York, John Wiley & Sons (Eds.), p.523.
- Nobrega, R.H., Greebe, C.D., van de Kant, H., Bogerd, J., de Franca, L.R. & Schulz, R.W. (2010). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS One*, Vol. 5, No. 9.
- Oatley, J.M. & Brinster, R.L. (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol Rev*, Vol. 92, No. 2, pp. 577-95.
- Oatley, J.M., Oatley, M.J., Avarbock, M.R., Tobias, J.W. & Brinster, R.L. (2009). Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development*, Vol. 136, No. 7, pp. 1191-9.
- Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K. & Miura, T. (2007). Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol Reprod*, Vol. 77, No. 6, pp. 970-7.
- Orth, J.M. (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec*, Vol. 203, No. 4, pp. 485-92.
- Orth, J.M., Gunsalus, G.L. & Lamperti, A.A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, Vol. 122, No. 3, pp. 787-94.
- O'Shaughnessy, P.J., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K. & Abel, M.H. (2009). Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction*, Vol. 139, No. 1, pp. 177-84.

- Palmero, S., Prati, M., Barreca, A., Minuto, F., Giordano, G. & Fugassa, E. (1990). Thyroid hormone stimulates the production of insulin-like growth factor I (IGF-I) by immature rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*, Vol. 68, No. 1, pp. 61-5.
- Petersen, C. & Soder, O. (2006). The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res*, Vol. 66, No. 4, pp. 153-61.
- Petley, T., Graff, K., Jiang, W., Yang, H. & Florini, J. (1999). Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses. *Horm Metab Res*, Vol. 31, No. 2-3, pp. 70-6.
- Pitetti, J.L., Calvel, P., Zimmermann, C., Conne, B., Papaioannou, M.D., Aubry, F., Cederroth, C.R., Urner, F., Fumel, B., Crausaz, M., Docquier, M., Herrera, P.L., Pralong, F., Germond, M., Guillou, F., Jegou, B. & Nef, S. (2013). An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol Endocrinol*, Vol. 27, No. 5, pp. 814-27.
- Planas, J.V. & Swanson, P. (1995). Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins (GTH I and GTH II) in vitro. *Biol Reprod*, Vol. 52, No. 3, pp. 697-704.
- Planas, J.V., Swanson, P. & Dickhoff, W.W. (1993). Regulation of testicular steroid production in vitro by gonadotropins (GTH I and GTH II) and cyclic AMP in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 91, No. 1, pp. 8-24.
- Pudney, J. (1995). Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech*, Vol. 32, No. 6, pp. 459-97.
- Pudney, J. (1996). Comparative Cytology of the Leydig Cell. In: The Leydig Cell. Payne, A. H.; Hardy, M. P.; Russell, L. D. (Eds.). Vienna, IL: Cache River Press, p. 98-142.
- Rao, J.N., Liang, J.Y., Chakraborti, P. & Feng, P. (2003). Effect of thyroid hormone on the development and gene expression of hormone receptors in rat testes in vivo. *J Endocrinol Invest*, Vol. 26, No. 5, pp. 435-43.
- Redding, J. M.; Patiño, R. (1993). Reproductive physiology. In: The physiology of fishes. Evans, D. H. (Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. p. 503-534.
- Reinecke, M. (2010). Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone-insulin-like growth factor-I system. *J Fish Biol*, Vol. 76, No. 6, pp. 1233-54.
- Reynolds, J.G., McCalmon, S.A., Tomczyk, T. & Naya, F.J. (2007). Identification and mapping of protein kinase A binding sites in the costameric protein myospryn. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1773, No. 6, pp. 891-902.
- Rolland, A.D., Lardenois, A., Goupil, A.S., Lareyre, J.J., Houlgatte, R., Chalmel, F. & Le Gac, F. (2013). Profiling of androgen response in rainbow trout pubertal testis: relevance to male gonad development and spermatogenesis. *PLoS One*, Vol. 8, No. 1, pp. e53302.
- Russell LD, Bartke A, Goh JC (1989). 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. *Am J Anat*, 184:179-189
- Russell, L. D.; Ettl, R. A.; Sinha-Hikim, A. P.; Clegg, E. D. (1990). In: Mammalian spermatogenesis. Russell, L. D.; Ettl, R. A.; Sinha-Hikim, A. P., Clegg, E.D. (Eds.). Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press, p.1-40.
- Sahoo, D.K., Roy, A., Bhanja, S. & Chainy, G.B. (2008). Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation. *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 156, No. 1, pp. 63-70.
- Saito, N., Takeuchi, T., Kawano, A., Hosaka, M., Hou, N. & Torii, S. (2011). Luminal interaction of phogrin with carboxypeptidase E for effective targeting to secretory granules. *Traffic*, Vol. 12, No. 4, pp. 499-506.

- Sambroni, E., Rolland, A.D., Lareyre, J.J. & Le Gac, F. (2013). FSH and LH have common and distinct effects on gene expression in rainbow trout testis. *J Mol Endocrinol*, Vol. 50, No. 1, pp. 1-18.
- Savitt, J., Singh, D., Zhang, C., Chen, L.C., Folmer, J., Shokat, K.M. & Wright, W.W. (2012). The in vivo response of stem and other undifferentiated spermatogonia to the reversible inhibition of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in the adult. *Stem Cells*, Vol. 30, No. 4, pp. 732-40.
- Schindler, M., Fischer, S., Thieme, R., Fischer, B. & Santos, A.N. (2013). cAMP-responsive element binding protein: a vital link in embryonic hormonal adaptation. *Endocrinology*, Vol. 154, No. 6, pp. 2208-21.
- Schulz, R.W., de Franca, L.R., Lareyre, J.J., Le Gac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H. & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 165, No. 3, pp. 390-411.
- Schulz, R.W., Menting, S., Bogerd, J., Franca, L.R., Vilela, D.A. & Godinho, H.P. (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis--evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod*, Vol. 73, No. 5, pp. 891-8.
- Schulz, R.W., van Dijk, W., Chaves-Pozo, E., Garcia-Lopez, A., de Franca, L.R. & Bogerd, J. (2012). Sertoli cell proliferation in the adult testis is induced by unilateral gonadectomy in African catfish. *Gen Comp Endocrinol*, Vol. 177, No. 1, pp. 160-7.
- Sharpe, R. M. (1994). Regulation of Spermatogenesis. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. & Neill, J. D. (Eds.). New York: Raven Press, p. 1363-1434.
- Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C. & Fisher, J.S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, Vol. 125, No. 6, pp. 769-84.
- Shetty, G., Weng, C.C., Meachem, S.J., Bolden-Tiller, O.U., Zhang, Z., Pakarinen, P., Huhtaniemi, I. & Meistrich, M.L. (2006). Both testosterone and follicle-stimulating hormone independently inhibit spermatogonial differentiation in irradiated rats. *Endocrinology*, Vol. 147, No. 1, pp. 472-82.
- Shetty, G., Wilson, G., Huhtaniemi, I., Boettger-Tong, H. & Meistrich, M.L. (2001). Testosterone inhibits spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion mice. *Endocrinology*, Vol. 142, No. 7, pp. 2789-95.
- Singh R, Hamada AJ, Agarwal A. (2011). Thyroid hormones in male reproduction and fertility. *Open Reprod Sci J*. 3:98-104.
- Skaar, K.S., Nobrega, R.H., Magaraki, A., Olsen, L.C., Schulz, R.W. & Male, R. (2011). Proteolytically activated, recombinant anti-mullerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. *Endocrinology*, Vol. 152, No. 9, pp. 3527-40.
- Soder, O., Bang, P., Wahab, A. & Parvinen, M. (1992). Insulin-like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis. *Endocrinology*, Vol. 131, No. 5, pp. 2344-50.
- Sridharan, S., Simon, L., Meling, D.D., Cyr, D.G., Gutstein, D.E., Fishman, G.I., Guillou, F. & Cooke, P.S. (2007). Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod*, Vol. 76, No. 5, pp. 804-12.
- St-Pierre, N., Dufresne, J., Rooney, A.A. & Cyr, D.G. (2003). 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*, Vol. 68, No. 4, pp. 1232-40.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. & Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, Vol. 291, No. 5813, pp. 293-6.

- Swapna, I., Rajasekhar, M., Supriya, A., Raghuveer, K., Sreenivasulu, G., Rasheeda, M.K., Majumdar, K.C., Kagawa, H., Tanaka, H., Dutta-Gupta, A. & Senthilkumaran, B. (2006). Thiourea-induced thyroid hormone depletion impairs testicular recrudescence in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, Vol. 144, No. 1, pp. 1-10.
- Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A. & Nishimune, Y. (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev*, Vol. 113, No. 1, pp. 29-39.
- Tarulli, G.A., Stanton, P.G. & Meachem, S.J. (2012). Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol Reprod*, Vol. 87, No. 1, pp. 13, 1-11.
- Tokalov, S.V. & Gutzeit, H.O. (2005). Spermatogenesis in testis primary cell cultures of the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev Dyn*, Vol. 233, No. 4, pp. 1238-47.
- Tres, L.L., Smith, E.P., Van Wyk, J.J. & Kierszenbaum, A.L. (1986). Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell co-cultures. *Exp Cell Res*, Vol. 162, No. 1, pp. 33-50.
- Vischer, H.F., Granneman, J.C., Linskens, M.H., Schulz, R.W. & Bogerd, J. (2003). Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor. *J Mol Endocrinol*, Vol. 31, No. 1, pp. 133-40.
- Voog, J. & Jones, D.L. (2010). Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell*, Vol. 6, No. 2, pp. 103-15.
- Wagner, M.S., Wajner, S.M. & Maia, A.L. (2008). The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol*, Vol. 199, No. 3, pp. 351-65.
- Wagner, M.S., Wajner, S.M. & Maia, A.L. (2009). Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis? *Microsc Res Tech*, Vol. 72, No. 11, pp. 796-808.
- Wang, D.S., Jiao, B., Hu, C., Huang, X., Liu, Z. & Cheng, C.H. (2008). Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 367, No. 2, pp. 336-41.
- Welsh, M., Saunders, P.T., Atanassova, N., Sharpe, R.M. & Smith, L.B. (2009). Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J*, Vol. 23, No. 12, pp. 4218-30.
- Westerfield, M. (2000). The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed: Eugene: University of Oregon.
- White, R., Rose, K. & Zon, L. (2013). Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nat Rev Cancer*, Vol. 13, No. 9, pp. 624-36.
- Yagci, A. & Zik, B. (2006). Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) in the developing and mature rat testes. *Anat Histol Embryol*, Vol. 35, No. 5, pp. 305-9.
- Yen, P.M., Ando, S., Feng, X., Liu, Y., Maruvada, P. & Xia, X. (2006). Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol*, Vol. 246, No. 1-2, pp. 121-7.
- Yomogida, K., Yagura, Y., Tadokoro, Y. & Nishimune, Y. (2003). Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biol Reprod*, Vol. 69, No. 4, pp. 1303-7.
- Yoshida, S. (2012). Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. *Reproduction*, Vol. 144, No. 3, pp. 293-302.
- Zhang, F.P., Poutanen, M., Wilbertz, J. & Huhtaniemi, I. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol*, Vol. 15, No. 1, pp. 172-83.
- Zhang, H., Kobayashi, R., Galaktionov, K. & Beach, D. (1995). p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell*, Vol. 82, No. 6, pp. 915-25.

- Zhou, Q. & Griswold, M.D. (2008). Regulation of spermatogonia. In: Stem Book. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute.
- Zou, S., Kamei, H., Modi, Z. & Duan, C. (2009). Zebrafish IGF genes: gene duplication, conservation and divergence, and novel roles in midline and notochord development. *PLoS One*, Vol. 4, No. 9, pp. e 7026.

**10- ANEXOS**  
**(Artigo publicado)**



## Thyroid Hormone Stimulates the Proliferation of Sertoli Cells and Single Type A Spermatogonia in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Testis

R. D. V. S. Morais, R. H. Nóbrega, N. E. Gómez-González, R. Schmidt, J. Bogerd, L. R. França, and R. W. Schulz

Laboratory of Cellular Biology (R.D.V.S.M., L.R.F.), Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; Reproductive Biology Group (R.D.V.S.M., R.H.N., N.E.G.-G., R.S., J.B., R.W.S.), Division of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands; and Department of Morphology (R.H.N.), State University of São Paulo, Botucatu, Brazil

Thyroid hormones participate in regulating growth and homeostatic processes in vertebrates, including development and adult functioning of the reproductive system. Here we report a new stimulatory role of thyroid hormone on the proliferation of Sertoli cells (SCs) and single, type A undifferentiated spermatogonia ( $A_{und}$ ) in adult zebrafish testes. A role for  $T_3$  in zebrafish testis is suggested by in situ hybridization studies, which localized thyroid receptor  $\alpha$  (*thr $\alpha$* ) in SCs and the  $\beta$  (*thr $\beta$* ) mRNA in Sertoli and Leydig cells. Using a primary zebrafish testis tissue culture system, the effect of  $T_3$  on steroid release, spermatogenesis, and the expression of selected genes was evaluated. Basal steroid release and Leydig cell gene expression did not change in response to  $T_3$ . However, in the presence of FSH,  $T_3$  potentiated gonadotropin-stimulated androgen release as well as androgen receptor (*ar*) and 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20 lyase (*cyp17a1*) gene expression. Moreover,  $T_3$  alone stimulated the proliferation of both SCs and  $A_{und}$ , potentially resulting in newly formed spermatogonial cysts. Additional tissue culture studies demonstrated that Igf3, a new, gonad-specific member of the IGF family, mediated the stimulatory effect of  $T_3$  on the proliferation of  $A_{und}$  and SCs. Finally,  $T_3$  induced changes in *connexin 43* mRNA levels in the testis, a known  $T_3$ -responsive gene. Taken together, our studies suggest that  $T_3$  expands the population of SCs and  $A_{und}$  involving Igf signaling and potentiates gonadotropin-stimulated testicular androgen production as well as androgen sensitivity.

The relationship between thyroid hormones (THs) and reproduction has been investigated in different vertebrate species (1). The effects of THs are mediated by specific intracellular thyroid hormone receptors (THR), members of the nuclear receptor superfamily, and similar to the situation in vertebrates in general, TH effects on reproduction in fish are complex (2).

Although potentially not valid for all mammalian species investigated (1), in rodents (rats, mice, and hamsters)  $T_3$  (the biologically most active TH) regulates testicular growth and pubertal maturation by stimulating the terminal differentiation of Sertoli cells (SCs), thereby deter-

mining the period during which they can proliferate (3–5). However, the differentiation state of adult mammalian SCs seems less terminal than has been thought for many years (6). With regard to sex steroid signaling, SC differentiation also involves  $T_3$ -mediated down-regulation of aromatase gene transcription (7) and up-regulation of androgen receptor gene expression (8). In the early 1990s, Cooke and coworkers (9, 10) showed that testis size and sperm output were enhanced in hypothyroid rats. Further studies demonstrated that  $T_3$  can directly suppress proliferation and induce differentiation of cultured neonatal rat SCs (11), involving up-regulation of cyclin-dependent ki-

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2013 by The Endocrine Society

Received April 4, 2013. Accepted August 15, 2013.

Abbreviations:  $A_{und}$ , type A undifferentiated spermatogonia; BrdU, bromodeoxyuridine; CX, connexins; DIG, digoxigenin; IGF1R, IGF 1 receptor; ISH, in situ hybridization; 11-KT, 11-ketotestosterone; qPCR, quantitative PCR; SC, Sertoli cell; TH, thyroid hormone; THR, thyroid hormone receptor.

nase inhibitors (12), thereby eliminating mitogenic effects of FSH (13). Moreover, TH reduced the expression of the neural cell adhesion molecule in SC-gonocyte cocultures isolated from neonatal rat testis (14). Another marker for SC differentiation/maturation in mammals is the expression of connexins (CXs) (15). Gilleron and coworkers (16) demonstrated that  $T_3$  increased the levels of CX43, an important gap junctional protein that participates in the control of cell proliferation. Male mice with a SC-specific loss of CX43 show an arrest of spermatogenesis at the level of spermatogonia or display a SC-only syndrome (17). In two fish species, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*), four different Cxs/cxs were identified in the testis (18, 19), and Cx43 may be involved in maturation of trout testis because its expression levels increased during the onset of spermatogenesis.

TH plays a critical role in the onset of Leydig cell differentiation and stimulation of steroidogenesis in postnatal rat (20) by increasing the expression of steroidogenic acute regulatory protein. Stimulatory effects on gonadal steroidogenesis have been reported for different species, such as rat (21) and goldfish (22). TH effects on steroidogenesis can be direct or via modulation of gonadotropin-stimulated steroid release, at least in mammals (21).

In contrast to the situation in mammals, fish (and amphibians) show the cystic type of spermatogenesis (23), in which cytoplasmic extensions of SCs form cysts by enveloping a synchronously developing germ cell clone derived from a single spermatogonial cell, the type A undifferentiated spermatogonia ( $A_{und}$ ). The cyst-forming SCs retain their capacity to proliferate also in the adult fish testis (24), and because growth and development of spermatogenic cysts in the adult testis involve an increase in the number of SCs per cyst (24, 25), SC proliferation can be expected in the adult, spermatogenetically active fish testis. The cytoskeleton of SCs and dynamic junctional complexes between SC-SC and SC-germ cell are important for SC functions (26, 27). Both gap junctions and tight junctions form between SC as part of the SC barrier (previously known as blood-testis barrier), which in fish forms later than in mammals, namely at the beginning of the spermiogenic phase of cyst development (25, 28). It is known that gap junctions between SCs and SCs and germ cells are essential for spermatogenesis and for male fertility (27). Because TH modulate the expression of CXs (19, 20), connexin gene expression may be a useful parameter in studies on  $T_3$  effects in zebrafish testis tissue culture.

In all vertebrates, THR $\alpha$ s are expressed by several different cell types, and hence, THs have pleiotropic effects, including effects on the gonads. In goldfish, recent *in vivo* and *in vitro* studies suggested that THs affect gonadal steroid synthesis and steroid receptor expression (2). In

fact, most experimental studies to date have focused on TH effects on the developing testes and only limited data are available regarding to adult testis functions, whereas direct effects of TH on the fully mature testis have not been studied yet.

The present study addresses the following questions regarding potentially direct effects of TH on adult zebrafish testis: 1) Which testicular cell types express THR $\alpha$ s? 2) Does TH modulate testicular expression of selected testicular target genes? 3) Does TH alone, or in association with recombinant zebrafish FSH (r $z$ f FSH), modulate the steroidogenic process? 4) Does TH change the proliferation and differentiation status of SCs and germ cells?

## Materials and Methods

### Animals

Sexually mature male zebrafish (*Danio rerio*) between 6 and 12 months of age were used in the present study. The animals were kept and handled according to the Dutch national regulation and experiments were approved by the Utrecht University animal use and care committee.

### Testicular explants

To study effects of  $T_3$  (Sigma-Aldrich) on androgen release, spermatogenesis, and gene expression, a previously described *ex vivo* organ culture system for zebrafish testis was used (29). Several experiments were conducted (Supplemental Figure 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>), including  $T_3$  dose response (2, 10, and 50 ng/mL) experiments to study gene expression and androgen release. For morphological evaluation, a concentration of 50 ng  $T_3$ /mL was selected. The two testes from each fish were incubated in parallel, one testicle (randomly chosen) serving as control for the contralateral one; eight replicates were used for each of the different conditions.

### Morphological analysis

After 4 days in culture, zebrafish testes ( $n = 8$ ) were fixed in 4% buffered glutaraldehyde at 4°C overnight, dehydrated, embedded in Technovit 7100 (Heraeus Kulzer), sectioned at 4  $\mu$ m thickness, and stained with toluidine blue, according to conventional histological procedures.

### Germ and somatic cell proliferation analysis

To evaluate whether  $T_3$  affects the proliferative activity of single spermatogonia  $A_{und}$  or SCs, 50  $\mu$ g/mL bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma-Aldrich) was added to the medium during the last 6 hours of culture (Supplemental Figure 1A). To study if  $T_3$  action involves the IGF signaling pathway, zebrafish testes were exposed to  $T_3$  in the absence or presence of 10  $\mu$ M NVP-AEW541 (Selleckchem), an IGF 1 receptor (IGF1R) kinase inhibitor that prevents autophosphorylation of IGF1R and hence blocks IGF receptor function (30), also in zebrafish (31). For data presentation (Figures 5 and 6) and statistical evaluation, the proliferation results from the experiments shown in Supplemental

Figure 1, A and B, where tissue was exposed to 50 ng/mL of  $T_3$ , were compared. Because no significant difference was found, the data were combined to form a single group ( $n = 16$ ). This group was compared to the basal condition ( $n = 8$ ) and to  $T_3$ +NVP ( $n = 8$ ). Zebrafish testes were fixed at 4°C overnight in freshly prepared methacarn (60% [v/v] absolute ethanol, 30% chloroform, and 10% acetic acid), after which the tissue was dehydrated, embedded in Technovit 7100, sectioned at 3  $\mu$ m thickness, and submitted to BrdU immunodetection, as described previously by Leal and coworkers (29).

### In vitro 11-ketotestosterone (11-KT) release by zebrafish testes

The androgen release capacity of zebrafish testicular tissue was measured after 1 day of ex vivo culture in two experiments. First, zebrafish testes were incubated in control medium or medium containing 50 ng/mL  $T_3$  (Supplemental Figure 1A). In the second experiment, testes were exposed to medium containing 2.5 ng/mL rzf FSH or to medium containing 2.5 ng/mL rzf FSH

and 2, 10, or 50 ng/mL  $T_3$  (Supplemental Figure 1C). The 11-KT release into culture medium was quantified using a steroid release bioassay previously adapted for zebrafish testis (32). The results were calculated as nanograms of 11-KT released per milligram of testis tissue.

### Gene expression analysis by real-time, quantitative PCR (qPCR)

The capacity of  $T_3$  (2, 10, or 50 ng/mL) to modulate testicular gene expression was investigated after incubation periods of 1 or 4 days. Total RNA was extracted from the samples using an RNAqueous-Micro Kit (Ambion), following the manufacturer's instructions. To estimate relative mRNA levels of selected genes (Table 1), qPCR was performed as described by de Waal and coworkers (32). The levels of elongation factor 1 $\alpha$  (*ef1 $\alpha$* ) mRNA served as endogenous control RNA, which remained stably expressed under the different experimental conditions (Supplemental Figure 2). All qPCRs were performed in 20  $\mu$ L reaction volume and C<sub>q</sub> values were determined in a 7900HT Real-Time

**Table 1.** Primers Used for Gene Expression Studies and to Generate DNA Templates for DIG-labeled cRNA Probe Syntheses for In Situ Hybridization

Target Gene	Primers	Sequence (5' → 3')
<b>Amh</b>	AD (Fw)	CTCTGACCTTGATGAGCCTCATT
	AE (Rv)	GGATGTCCCTTAAGAACCTTTGCA
	AF (probe)	FAM-ATTCCACAGGATGAGAGGCTCCCATCC-TAMRA
<b>Ef1<math>\alpha</math></b>	AG (Fw)	GCCGTCCACCGACAAG
	AH (Rv)	CCACACGACCCACAGGTACAG
	AI (probe)	FAM-CTCCAATTTGTACACATCCTGAAGTGGA-TAMRA
<b>igf3</b>	2680 (Fw)	TGTGCGGAGACAGAGGCTTT
	2681 (Rv)	CGCCGCACTTTCTTGATT
<b>igf1<math>\alpha</math></b>	2362 (Fw)	TACATCGCTGGCAACAAGCA
	2363 (Rv)	TCATTGAAACTGGTCTTATGCAAT
<b>igf1<math>\beta</math></b>	2595 (Fw)	GTGCTGGTCTCTCCACACTCT
	2596 (Rv)	TTACCGATGTCGTTGCCAATATC
<b>cx43</b>	3856 (Fw)	CTACAGGGCTCTCCACTCTTACTTCT
	3858 (Rv)	CGCACTCCAGTCACCCATCT
<b>cx43.4</b>	3859 (Fw)	CGTAGCTGAGGAAAAGAGTGGA
	3860 (Rv)	CGTAAGAAAACCTCCAGCTCATGGT
<b>ar</b>	2412 (Fw)	ACGTGCCTGGCGTGAAAA
	2413 (Rv)	CAAACCTGCCATCCGTGAAC
<b>insl3</b>	2466 (Fw)	TGCGATCGTGTGGGAGTTT
	2467 (Rv)	TGCACAACGAGGTCTCTATCCA
<b>star</b>	2546 (Fw)	CCTGGAATGCCTGAGCAGAA
	2547 (Rv)	ATCTGCACTTGGTGCATGAC
<b>cyp17a1</b>	2773 (FW)	GGGAGGCCACGGACTGTTA
	2774 (Rv)	CCATGTGGAACCTGTAGTCAGCAA
<b>dazl</b>	3104 (Fw)	AGTGCAGACTTTGCTAACCCTTATGTA
	3105 (Rv)	GTCCACTGCTCCAAGTTGCTCT
<b>piwil1</b>	2542 (Fw)	GATACCGCTGCTGGAAAAAGG
	2543 (Rv)	TGGTCTCCAAGTGTGCTTGC
<b>piwil2</b>	2994 (Fw)	TGATACCAGCAAGAAGAGCAGATCT
	2995 (Rv)	ATTTGGAAGGTCACCCCTGGAGTA
<b>thr<math>\alpha</math></b>	3691 <sup>a</sup> (Fw)	T3Rpps-TCAAACAAATAACATACTAACACTTTCTTCTAAGTGGA
	3692 <sup>b</sup> (Rv)	T7Rpps-CCATTGCGTCTCATCTCCTTCTG
<b>thr<math>\beta</math></b>	3695 <sup>a</sup> (Fw)	T3Rpps-TCAATTCAGGCCACGTATGTCGGATC
	3696 <sup>b</sup> (Rv)	T7Rpps-TAATTGGTATGTACCCATTCTGCATGGCCTC

<sup>a</sup> Primer 3691 and 3695 contain the T3 RNA polymerase promoter sequence (underlined) at its 5'-end (T3Rpps; 5'-GGGCGGGTGTATTAAACCTCACTAAAGGG-3').

<sup>b</sup> Primer 3692 and 3696 contain the T7 RNA polymerase promoter sequence (underlined) at its 5'-end (T7Rpps; 5'-CCGGGGGGTGTAAATACGACTCACTATAGGG-3').

PCR System (Applied Biosystems) using default settings. Relative mRNA levels were calculated as reported previously (32, 33).

### In situ hybridization

Zebrafish *thra* and *thrβ*-specific PCR products were generated with primers 3691–3692 and 3695–3696 (Table 1), respectively, containing either T3 (primers 3691 and 3695) or T7 (primers 3692 and 3696) RNA polymerase-promoter sequences attached at their 5'-ends. The ~450- and ~455-bp PCR products obtained were gel purified and served as templates for digoxigenin (DIG)-labeled cRNA probe syntheses, as described by Vischer and coworkers (34). Whole-mount in situ hybridization (ISH) was used to localize thyroid hormone receptor (*thra* and *thrβ*) mRNAs in testicular tissue fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4), according to previously described methods (35). The tissue was treated with proteinase K (20 μg/mL; Sigma-Aldrich) at 37°C for 20 minutes, and acetic anhydride (0.25% in 0.1 M triethanolamine [pH 8.0]; Merck) was included to reduce background after postfixation and before prehybridization. Hybridization with T3 and T7 DIG-riboprobes was performed overnight at 72°C, and DIG immunostaining was performed on the following day using anti-conjugated alkaline phosphatase (1:2000; Roche). Staining was revealed with nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate (both Sigma-Aldrich), followed by three consecutive PBS washings. Then, tissue was fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, dehy-

drated, and embedded in Technovit 8100 (Heraeus Kulzer) for plastic sectioning. Sections of 7 μm thickness were counterstained with 0.1% Nuclear Fast Red (in 5% aluminum sulphate solution) for 2 minutes and washed in running tap water for 5 minutes. After a rinse in deionized water, air-dried sections were mounted with Aqueous Mounting Medium (Dako North America Inc).

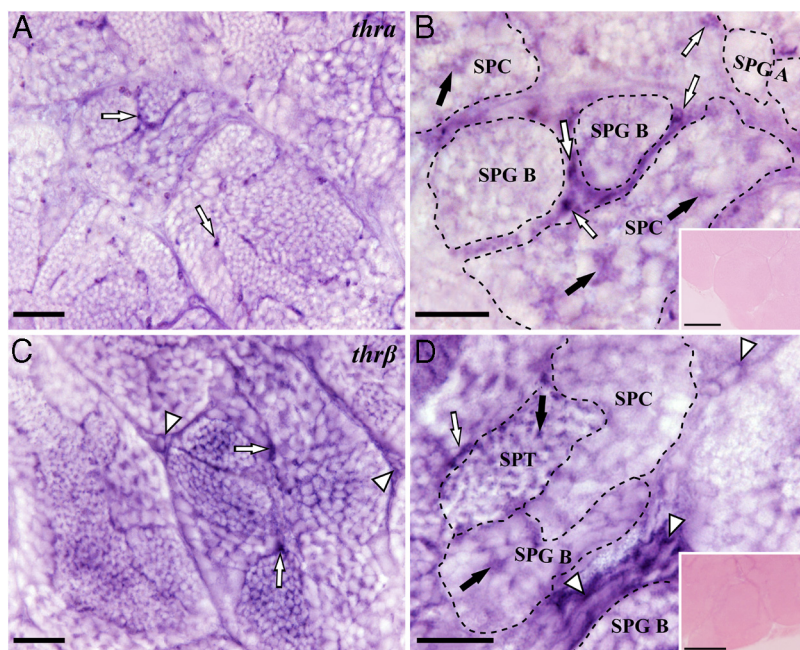
### Statistical analysis

For the ex vivo experiments, differences between control and treatment for the measured parameters (ie, BrdU-positive SCs [Figure 6C], relative mRNA levels, androgen release) were tested for statistical significance using the Student's *t* test for paired observations; significant differences are indicated by an asterisk. When comparisons were made over three or more conditions (ie, *connexin* mRNA levels, mitotic index of SCs, and type A spermatogonia), data were analyzed by one-way ANOVA, followed by a Tukey's multiple comparison test; significant differences are indicated by different lowercase letters. In some cases, data were log transformed to achieve an equal variance. A significance level (*P*) < .05 was applied in all statistical analyses, for which we used the Prism4 software package (GraphPad). Data are presented as the mean ± SEM.

## Results

### Thyroid hormone receptor mRNA localization in zebrafish testis

Identification of the cell types expressing the mRNAs coding for the two THR<sub>s</sub> described for zebrafish (*thra* and *thrβ* mRNA) was accomplished by ISH. Based on the shape and localization of the stained cells in the tubular or intertubular compartments, the cells specifically labeled were identified as Sertoli and Leydig cells (Figure 1). The *thra* mRNA signal was detected in SCs only (Figure 1A). Labeled SCs were in contact with germ cells at different stages of differentiation (Figure 1B). The *thrβ* mRNA signal was localized in both Sertoli and Leydig cells (Figure 1, C and D). For both receptors, labeling also appeared as thin stretches between germ cells in the lumen of spermatogenic cysts (eg, in cysts containing spermatocytes [Figure 1B] or spermatids [Figure 1D]). No specific signal was obtained when sections were incubated with the sense *thra* and *thrβ* probes (Figure 1, insets).



**Figure 1.** Localization of THR mRNAs in zebrafish testis using whole-mount ISH and post hybridization embedding and sectioning. low (A and C) and high (B and D) magnifications of 7-μm-thick sections of zebrafish testis, hybridized with the *thra* and *thrβ* antisense cRNA probes. Staining representing *thra* mRNA (A and B) was found in SCs (white arrows) enveloping germ cells in different stages of differentiation, while *thrβ* mRNA staining (C and D) was found in both SCs (white arrows) and Leydig cells (arrowheads). Signals for both THR<sub>s</sub> were also observed in between germ cells (black arrows; see Discussion). No specific staining was obtained with the sense cRNA probes (insets in B and D). Dashed lines indicate cysts containing SPC, spermatocytes; SPG A, type A differentiated spermatogonia; SPG B, type B spermatogonia; SPT, spermatids. The different germ cell types were identified by a combination of their size and number of cells per cyst (see ref. 25). Bars, 25 μm.

## Triiodothyronine effects on gene expression and androgen release

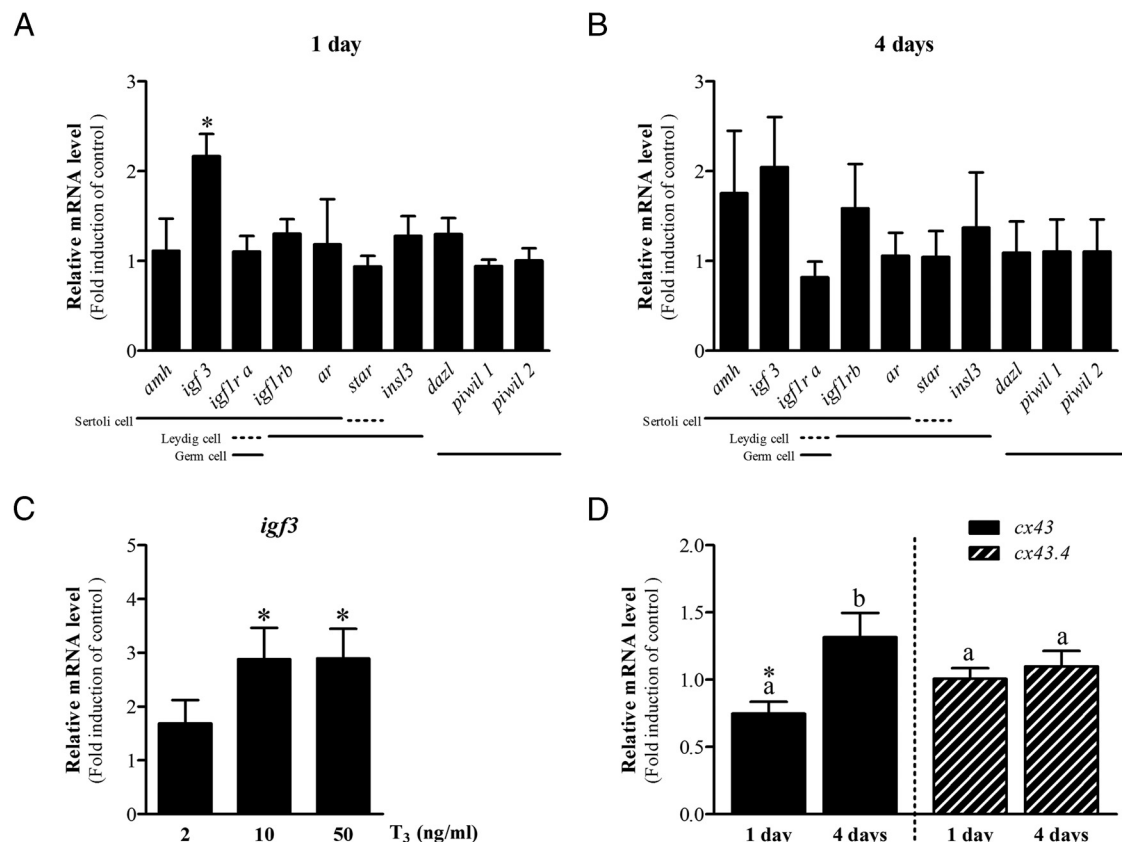
To investigate if  $T_3$  changes gene expression in the zebrafish testis, mRNA levels of selected Sertoli, Leydig, and germ cell genes (Table 1) were quantified. In a first experiment using 50 ng  $T_3$ /mL, only the mRNA levels for IGF 3 (*igf3*), a gonad-specific IGF subtype recently discovered in teleost fish (36), changed significantly on day 1 of the culture (Figure 2A). We repeated the analysis using different doses of  $T_3$ , which showed that *igf3* mRNA levels were up-regulated after 1 day in response to the intermediate and highest dose of  $T_3$ , 10 and 50 ng/mL, respectively (Figure 2C). No significant response to 50 ng/mL  $T_3$  was observed after 4 days of incubation (Figure 2, A and B). Studying the effect of  $T_3$  on the mRNA levels of two CXs, a transient down-regulation of *cx43* mRNA levels was observed after 1 day of culture (Figure 2D), which recovered after 4 days. No change was observed in the mRNA levels of *cx43.4* in response to  $T_3$ .

The release of 11-KT in culture medium was measured after 1 day of culture (Supplemental Figure 1, A and C).

Exposure to  $T_3$  alone did not change 11-KT release (Figure 3A). However,  $T_3$ -dose response studies in combination with rzf FSH demonstrated that at the highest dose (50 ng  $T_3$ /mL) the androgen release was significantly enhanced when compared to rzf FSH only, which in turn clearly stimulated androgen release above the levels found under basal conditions or in the presence of  $T_3$  alone. Moreover, *ar* and *cyp17a1* gene expression was not different from the one under basal conditions when testis tissue was incubated with  $T_3$  alone, while  $T_3$  enhanced FSH-stimulated *ar* and *cyp17a1* gene expression significantly in the presence of 50 ng/mL  $T_3$  (Figure 3B). Previous results showed that rzf FSH alone did not change *ar* mRNA levels but led to a fourfold increase in *cyp17a1* mRNA levels (37). These results suggest that  $T_3$  plays a permissive role for stimulatory effects of FSH on androgen production and androgen sensitivity in adult zebrafish testis tissue.

## Triiodothyronine stimulates germ and SC proliferation

Morphological analysis showed that in testes incubated with basal medium or with  $T_3$ , the testicular cyto-archi-



**Figure 2.** Gene expression analysis after 1 or 4 days of zebrafish testis tissue culture. (A, B) Relative mRNA levels of Sertoli, Leydig, and germ cell marker genes in testicular explants incubated with  $T_3$  (50 ng/mL) for 1 or 4 days. Bars represent the relative mRNA levels (fold of basal; mean  $\pm$  SEM; n = 8). Solid lines (—) indicate genes repeatedly localized to the indicated cell types. Dotted lines (••••) indicate genes reported to be expressed in the indicated cell types in some but not all studies. (C) Relative mRNA levels of *igf3* after  $T_3$  dose response after 1 day of incubation (fold of control; mean  $\pm$  SEM; n = 6). (D) Testicular mRNA levels of two CXs (*cx43* and *cx43.4*) in tissue after 1 or 4 days of exposure to  $T_3$  (fold of basal; mean  $\pm$  SEM; n = 8). For each gene, different letters indicate significant differences ( $P < .05$ ) over time. \*, significant difference compared to the respective basal condition ( $P < .05$ ).

ture remained intact. The spermatogenic process appeared normal and we observed cysts with germ cells at all stages of differentiation, including free spermatozoa in the lumen of seminiferous tubules (Figure 4, A and B). Analyzing the effects of  $T_3$  on spermatogenesis after 4 days of tissue culture (Figure 4C) revealed a higher volume fraction ( $P < .05$ ) of single type  $A_{und}$  spermatogonia cysts and fewer cysts with spermatids ( $P < .05$ ) in comparison with the control testes. To determine if  $T_3$  also changed the proliferation activity of these spermatogonia, their mitotic index was obtained. Quantitative evaluation of the sections after immunocytochemical detection of BrdU showed a significantly higher proportion of BrdU-positive type  $A_{und}$  spermatogonia in  $T_3$ -treated tissue (Figure 5), suggesting that a stimulation of proliferation of this germ cell type is the basis for the increased volume fraction of these cells in morphometric analysis (Figure 4).

Proliferation of SCs was observed as well (Figure 6A). Quantitative evaluation showed that  $\sim 30\%$  of the SCs were BrdU-positive after  $T_3$  treatment compared with only  $\sim 9\%$  in the control group (Figure 6B). BrdU-labeled SCs can occur in association with germ cells forming spermatogenic cysts, or as “free” SCs (ie, not associated with

germ cells). Intriguingly, closer analysis of the BrdU-labeled SCs showed that the majority was either free or associated with type A spermatogonia, whereas the minority was associated with type B spermatogonia, spermatoocytes, and spermatids (Figure 6C).

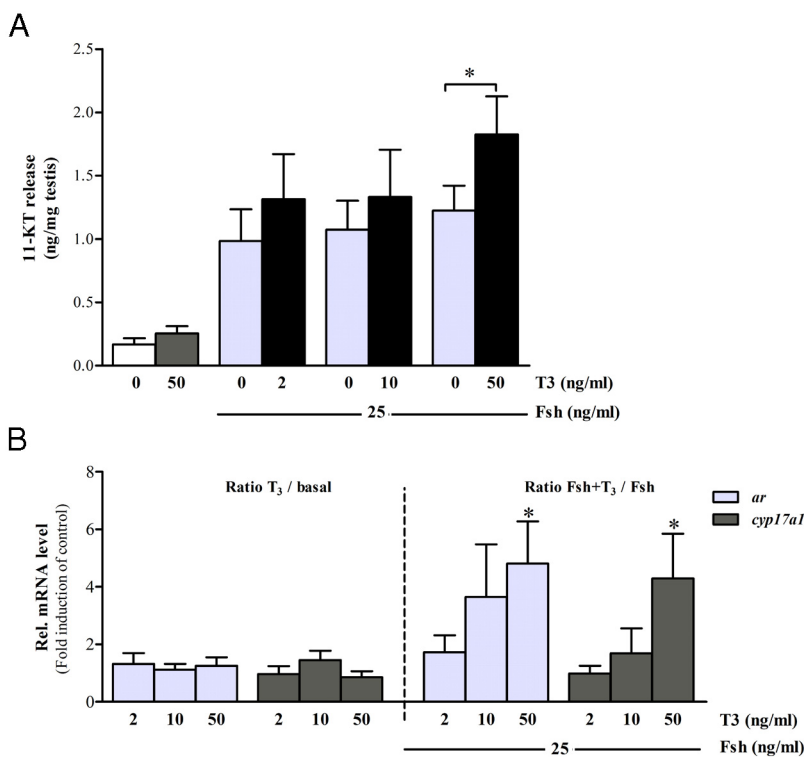
Members of the IGF family are known for their mitogenic activity and we observed that  $T_3$  induced an increase of testicular *igf3* mRNA levels (Figure 2, A and C). Therefore, we studied whether  $T_3$ -stimulated proliferation of  $A_{und}$  and SCs depended on the functioning of IGF receptors (Supplemental Figure 1B). Incubating testis tissue with  $T_3$  in the absence or presence of the IGF receptor inhibitor NVP-AEW541 showed that  $T_3$ -induced BrdU incorporation into  $A_{und}$  (Figure 5) or SCs (Figure 6) was abolished or reduced, respectively, leading to a significant decrease ( $P < .05$ ) of the BrdU-labeling index of these two cell types.

## Discussion

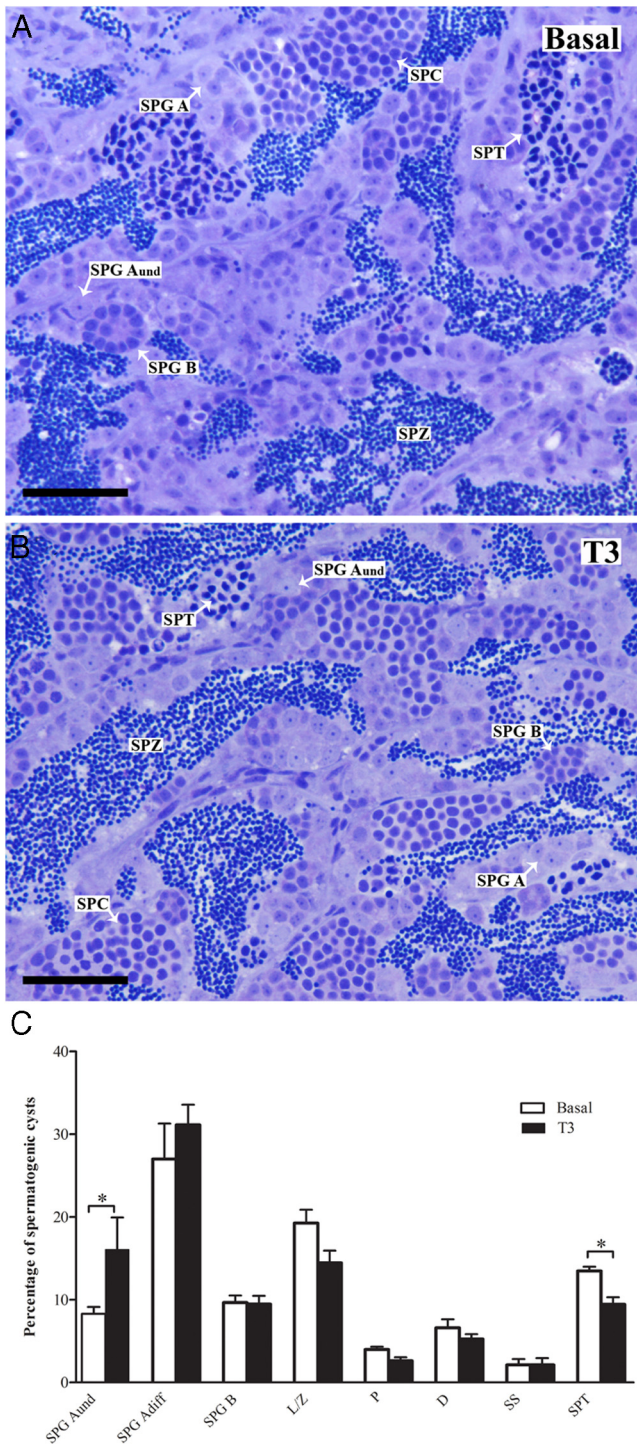
In vertebrates, THs have several functions and THR expression in the testis suggests THs participate in regulating male reproduction. In the present study, we investigated

potential roles of  $T_3$ , alone or in combination with rzf FSH, on adult zebrafish steroidogenesis and spermatogenesis, using morphological, physiological, and molecular approaches.

It is known that THs work via their specific intracellular THRs, and studies on the *thra* and *thr $\beta$*  mRNA levels in testis tissue of the seasonally reproducing brook trout demonstrated seasonal variations with a constant expression throughout spermatogenesis while the higher expression pattern was observed after spawning season (20). However, the testicular cell types expressing the THRs have not been clearly identified in fish. In mammals, THRs have been localized to SCs by different laboratories, while the staining in germ cells and in interstitial cells is debated (38, 39). Also in zebrafish, information on the testicular cell types expressing THRs is missing but is needed to direct further studies as regards physiological functions of THs in the testis. We found that SCs,



**Figure 3.** Ex vivo androgen release and gene expression analysis in adult zebrafish testis. (A) Androgen release after 1 day of incubation under basal conditions and with 50 ng/mL  $T_3$  or after exposure to different doses of  $T_3$  in the presence or absence of 25 ng/mL rzf FSH. Results are given as the amount of 11-KT produced in nanogram per milligram weight of testis tissue incubated. (B) Testicular *ar* and *cyp17a1* mRNAs levels (fold of basal; mean  $\pm$  SEM;  $n = 8$ ) after 1 day of exposure to different doses of  $T_3$ , alone or in combination with rzf FSH. \*, significant difference from the respective control ( $P < .05$ ).



**Figure 4.** Morphological analysis of zebrafish testis after tissue culture. (A, B) Histological sections stained with toluidine blue showing normal cyto-architecture of zebrafish testis after 4 days of tissue culture with or without 50 ng/mL of T<sub>3</sub>. All germ cell types were present in the testis. (C) Morphometric quantification (% of the total number of cysts at different stages of germ cell development; mean  $\pm$  SEM; n = 8) of the different germ cell cysts in zebrafish. D, diplotene primary spermatocytes; LZ, leptotene/zygotene primary spermatocytes; P, pachytene primary spermatocytes; SPG A<sub>diff</sub>, type A differentiated spermatogonia; SPG A<sub>und</sub>, type A undifferentiated spermatogonia; SPG B; type B spermatogonia; SPT, spermatids; SPZ, spermatozoa; SS, secondary spermatocytes. Bars marked with asterisk are significantly

contacting germ cells in different stages of spermatogenesis, expressed both THR forms while Leydig cells expressed *thr $\beta$*  only. We also found stained areas between germ cells in a number of (often larger) cysts. In cod testis intermediate cytoskeletal protein of SCs, vimentin, also was detected in between germ cells (40). Similarly, FSH receptor protein localization by immunohistochemistry in eel testis revealed staining in between germ cells (41). These data suggest that SCs forming a spermatogenic cyst do not form a simple, sac-like space but may show a more complex structure toward the germ cell-contacting luminal side of the cyst, perhaps with cytoplasmic extensions inserted between germ cells. Future morphological/ultrastructural work may provide evidence for this assumption. Collectively, our data indicate that THs modulate testicular functions via two important somatic cell types, the Sertoli and Leydig cells, whereas direct effects on germ cells seem unlikely in zebrafish. As in other vertebrates, the localization of *thra* also in zebrafish SCs indicates that this cell type is an evolutionary conserved target for THs. As in some (but not all) other models (42, 43), we detected *thr $\beta$*  also in Leydig cells. In zebrafish germ cells were THR negative, different from reports in rat where germ cells from intermediate spermatogonia to pachytene spermatocytes expressed *Thra1* (38, 43). Our results suggest that TH effects on SC and germ cell proliferation are mediated by THRs in SC, whereas T<sub>3</sub>-modulation of steroidogenesis is mediated by *Thr $\beta$*  in Leydig cells. Modulatory effects of TH on androgen levels were described in rat in vivo (44), but our study provides original information on the fact that TH directly modulates zebrafish testicular androgen production (see below).

After 1 day of tissue culture, T<sub>3</sub> significantly increased the *igf3* mRNA levels. Interestingly, this gonad-specific *igf* type, recently discovered in fish but not present in tetrapod vertebrates (36), has been localized to SCs in adult zebrafish testis and may play a role in the recovery following a cytotoxic insult in adult zebrafish testis (45, 46). In hypothyroid rats T<sub>3</sub> greatly stimulated SC IGF1 production in vivo, also incubation of cultured SCs with T<sub>3</sub> increased the production of IGF1 (47). It appears that a stimulatory role of TH on the release of IGF family members by SCs is an evolutionary conserved mechanism in vertebrates.

Incubation of testicular fragments collected from maturing brook trout during the rapid growth phase of the testis with T<sub>3</sub> increased *cx43* mRNA levels (19). In our study, exposure of the fully grown adult testis to T<sub>3</sub> did not increase *cx43* mRNA levels significantly above control

**Legend to Figure 3 Continued. . .**

different from respective controls ( $P < .05$ ). Bars, 50  $\mu$ m.

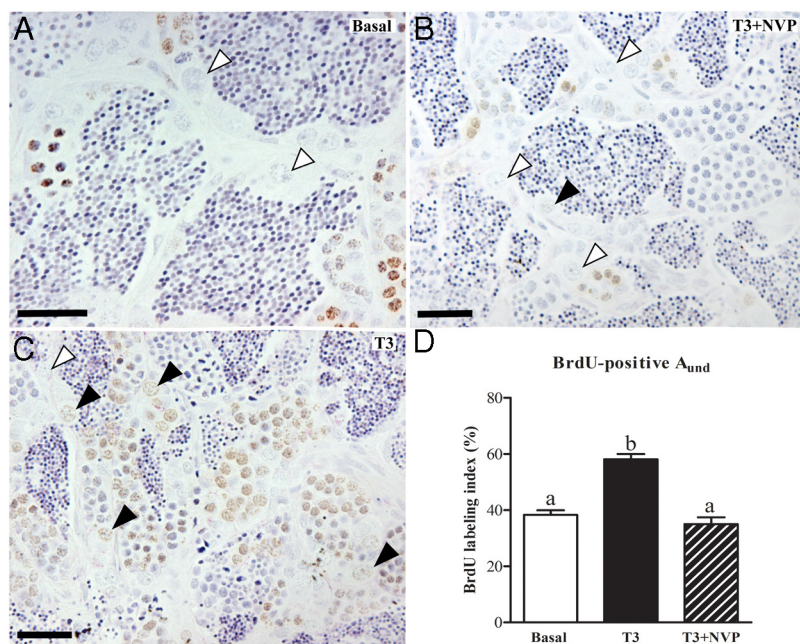
levels. However, comparing *cx43* mRNA levels over time, the levels first decreased after 1 day, before increasing in  $T_3$ -exposed tissue fragments toward day 4. In a murine SC line, THs increased *Cx43* mRNA levels and (16, 48) inhibited SC proliferation, which was associated with the expression of cell-cycle regulatory proteins such as S-phase kinase-associated protein 2 and cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 (also called CDKN1B) (16, 48–50). Conversely, in the SC-specific connexin 43 knockout mice (SC-*Cx43* KO), SC number was increased 73% compared with wild-type mice, indicating that CX43 is involved in the pubertal cessation of SC proliferation (13). In adult zebrafish testis, on the other hand, THs stimulated SC proliferation. Although THs may play distinct roles in piscine and mammalian testes, the downstream mechanisms underlying SC proliferation in both models may involve the down-regulation of *Cx43*. However, no changes were recorded for another extracellular matrix gene transcript (*cx43.4* mRNA).

THRs are ligand-regulated transcription factors that bind TH while being bound to DNA sequences of target genes where they can then interact with corepressor and coactivator complexes (51). Analyzing the  $T_3$  effects on the expression of selected target genes, we observed that the two Leydig cell genes *star* and *insl3* did not change significantly, and neither did basal androgen release. Sim-

ilarly, in goldfish, *in vitro* experiments demonstrated that  $T_3$  did not change androgen levels significantly (2). However, studying gonadotropin-stimulated estrogen release from maturing (early vitellogenic) ovarian follicles isolated from rainbow trout THs were found to amplify the steroidogenic gonadotropin effect (52). The present study showed that also for the adult zebrafish testis,  $T_3$  potentiated FSH effects on steroid release and gene expression. In the adult rat testis recovering from a cytotoxin-induced loss of Leydig cells, TH treatment stimulated Leydig cell recovery and increased androgen release (53), whereas in adult rat rendered transiently hypothyroid, the circulating testosterone levels were significantly decreased (44). In zebrafish,  $T_3$  alone did not modulate the acute androgen release, but clearly enhanced FSH-stimulated *cyp17a1* and *ar* gene expression and androgen release. Piscine Leydig cells express FSHr/*fshr* (41, 54) and FSH is a potent steroidogenic hormone in fish (37, 55), while previous studies (42) have shown that androgens do not stimulate *cyp17a1* gene expression, so that we can attribute the increased expression of this gene to FSH. Hence, our data suggest that in the presence of rzf FSH,  $T_3$  potentiates the trophic effects of FSH on the steroidogenic system in the adult zebrafish testis. At the same time,  $T_3$  had a permissive effect because it was only in concert with  $T_3$  that FSH increased *ar* gene expression. Hence,  $T_3$  increased both

androgen production and sensitivity of adult zebrafish testis tissue. In general, our findings support the concept of a direct, stimulatory crosstalk between THs and the androgen-producing system that was recently proposed to operate in vertebrates (56).

In testes treated with  $T_3$  for 4 days, the volume fraction of type  $A_{und}$  spermatogonia increased. Analyzing the BrdU-labeling index showed that proliferation of this particular germ cell type (but also of SCs) was stimulated. Interestingly, treatment of African catfish (*Clarias gariepinus*) with thiourea, a TH inhibitor, compromised spermatogenesis, leading to a decrease in spermatid/spermatozoa counts (57). This observation is compatible with the assumption that TH-stimulated production of type A spermatogonia and SCs (in conjunction with the enhanced androgen signaling) are relevant *in vivo*. Remarkably, in zebrafish, an IGF receptor inhibitor



**Figure 5.** Localization and quantification of BrdU incorporated during the last 6 hours of incubation into zebrafish testis tissue explants after 4 days in culture. Transverse section showing BrdU immunodetection in tissue incubated in basal medium (A), in the presence of 50 ng/mL  $T_3$  (B), or in medium containing 50 ng/mL  $T_3$  + 10  $\mu$ M NVP-AEW541 (C). (black arrowheads) BrdU-positive single type A undifferentiated spermatogonia ( $A_{und}$ ). (white arrowheads) unlabeled  $A_{und}$ . (D) BrdU labeling index of type  $A_{und}$  (% of total number of BrdU-positive  $A_{und}$ ). Bars, mean  $\pm$  SEM (n = 8 or 16; see *Materials and Methods*). Different letters indicate significant differences ( $P < .05$ ) between incubation conditions. Bars, 25  $\mu$ m.

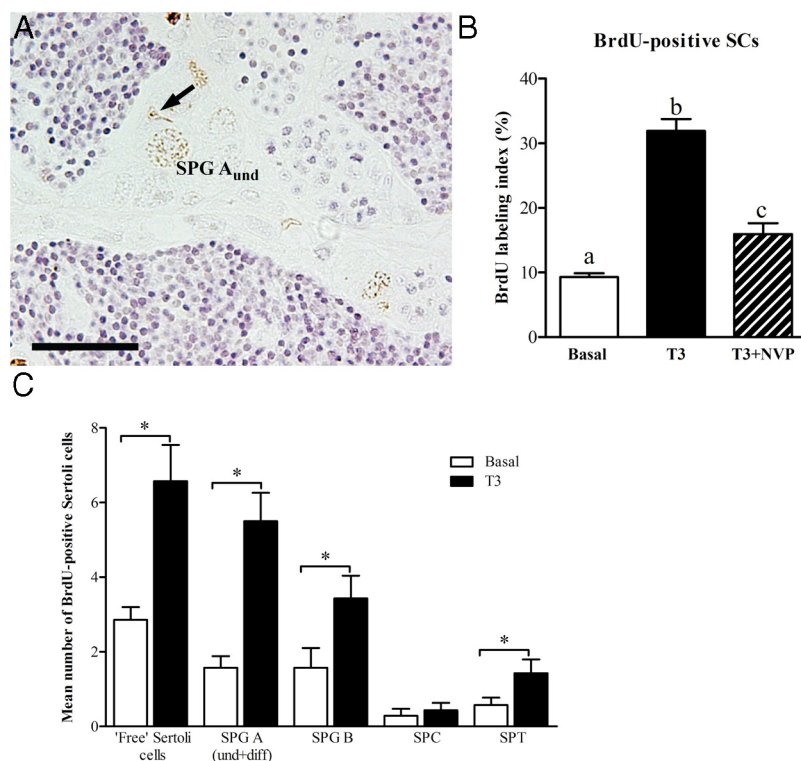


abolished the  $T_3$ -stimulated increase of the mitotic index of type  $A_{und}$  spermatogonia, demonstrating that  $T_3$ -stimulated proliferation of  $A_{und}$  spermatogonia is mediated via a factor activating IGF receptors in the zebrafish testis.

In mammals, the effect of  $T_3$  on SC proliferation has been comprehensively discussed. Several studies demonstrated that neonatal hypothyroidism and hyperthyroidism affect the number of SC by extending or shortening, respectively, the period of proliferation (3, 58, 59). Our observation of  $T_3$ -stimulated proliferation of SCs contrasts with the mammalian situation. On the other hand, SC proliferation is an expected event in the adult fish testis that accompanies growth and development of spermatogenic cysts (24) and probably involves activation of FSH signaling (60). Interestingly, in the present study, an important fraction of proliferating SCs was either associated with type A spermatogonia or was not associated with germ cells at all (referred to as “free” SCs). This suggests that this type of SC proliferation created additional germ cell support capacity, perhaps mediated by the THR forms

expressed by SCs. In addition, analyzing SC proliferation in the presence of the IGF receptor inhibitor, the BrdU-labeling index decreased, suggesting that  $T_3$ -stimulated SC proliferation is in part mediated by IGF/Igfr signaling. Our observations in zebrafish seem congruent with conclusions based on in vitro studies on mouse SC, where inactivation of the IGF1 receptor gene decreased SC proliferation and also increased SC apoptosis (30). Moreover, a recent study demonstrated that SC-specific loss of insulin/IGF signaling in mice strongly reduced SC proliferation and testis size (61). We propose that an evolutionary conserved mechanism to stimulate SC proliferation is mediated in zebrafish by the gonad-specific Igf3.

Considering that germ cells are THR negative, the  $T_3$ -induced increase in number and mitotic index of type  $A_{und}$  spermatogonia could be mediated by somatic cells, possibly SC. Elevated SC numbers may have allowed this spermatogonial population to expand, potentially supported by an increased availability of SC-derived growth factors stimulating spermatogonial development. Because our results have shown that the IGF signaling pathway mediated  $T_3$ -stimulated proliferation of SC and type  $A_{und}$  spermatogonia proliferation, it is tempting to speculate that  $T_3$  triggered an autocrine Igf3 loop to stimulate SC proliferation, and a paracrine loop to stimulate spermatogonial proliferation. Interestingly, in rainbow trout testis IGF receptor expression has been found in both somatic and germ cells (62). Assuming that newly formed SCs associate with single type  $A_{und}$  spermatogonia and hence form new spermatogenic cysts, the spermatogenic capacity of the testis would increase. On the other hand, hypothyroidism induced in vivo in pubertal Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) increased SC and germ cell numbers per cyst (63). This effect is not exactly opposite to the one that we have observed in adult zebrafish, because it was the size, not the number, of cysts that changed in pubertal tilapia testis. Hence, as described previously for mammals (14),  $T_3$  may play different roles depending on the ontogenetic stage of development and the species investigated (14).



**Figure 6.** Localization and quantification of BrdU incorporated during the last 6 hours of incubation into zebrafish testis explants incubated with 50 ng/mL  $T_3$  in the absence or presence of 10  $\mu$ M NVP-AEW541 ex vivo for 4 days. (A) Labeled SC nucleus (arrow) associated with a BrdU-positive single type  $A_{und}$  spermatogonium. (B) BrdU labeling index (% of total number cells) of SCs. Different letters indicate significant differences ( $P < .05$ ) between incubation conditions. (C) Treatment with  $T_3$  increased the labeling index of BrdU-labeled SCs associated, or not (“free”), with different germ cell cysts. SPG A (und+diff), type A undifferentiated and differentiated spermatogonia; SPG B, type B spermatogonia; SPC, spermatocytes; SPT, spermatids. “Free” SCs are apparently not associated with germ cells. Bars, mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$  or 16; see *Materials and Methods*). Bars marked with asterisk are significantly different from its respective basal condition control ( $P < .05$ ). Bar = 30  $\mu$ m.

## Conclusion

The direct effects of T<sub>3</sub> on the zebrafish testis are coordinated by receptors expressed by Sertoli and Leydig cells. When present alone, T<sub>3</sub> stimulates SC and type A<sub>und</sub> spermatogonia proliferation. When T<sub>3</sub> and FSH are present at the same time, we can expect an increase in the number of SC and single type A<sub>und</sub> spermatogonia, but also a potentiation of the steroidogenic activity of FSH and of the androgen sensitivity of the testis. Because androgens are known to stimulate in particular the somewhat more advanced stages of germ cell differentiation in fish (23, 64) and mammals (65), we speculate that the joint action of T<sub>3</sub> and FSH would result in more newly formed spermatogenic cysts that would then be stimulated to differentiate in an androgen-driven manner.

## Acknowledgments

We thank Wytse van Dijk, Mara Livia Santos, and Henk Schriek for technical help. Financial support from the Minas Gerais State Foundation (FAPEMIG), the European Union LIFE CYCLE project no. FP7/222719 for the Igf3-related work, and the scholarship awarded to R.D.V.S.M. from Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) are gratefully acknowledged.

Address all correspondence and requests for reprints to: Rüdiger W. Schulz, Department of Biology, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH, Utrecht, The Netherlands. E-mail: r.w.schulz@uu.nl.

This work was financially supported by Utrecht University, the European Union, and the Minas Gerais State Foundation (FAPEMIG).

Important aspect of the paper: The direct effects of T<sub>3</sub> on adult zebrafish testis include stimulation of proliferation of SCs and type A undifferentiated spermatogonia as well as potentiation of gonadotropin-stimulated androgen signaling.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

- Cooke PS, Holsberger DR, de Franca LR. Thyroid hormone regulation of Sertoli cell development. In: Skinner MK, Griswold MD, eds. *The Sertoli Cell Biology*. Elsevier; 2005; 217–226.
- Habibi HR, Nelson ER, Allan ER. New insights into thyroid hormone function and modulation of reproduction in goldfish. *Gen Comp Endocrinol*. 2012;175:19–26.
- Auharek SA, de Franca 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*. 2010;216:577–588.
- De Franca LR, Hess RA, Cooke PS, Russell LD. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec*. 1995;242:57–69.
- Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis? *Microsc Res Tech*. 2009;72:796–808.
- Tarulli GA, Stanton PG, Meachem SJ. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol Reprod*. 2012;87:13.
- Catalano S, Pezzi V, Chimento A, et al. Triiodothyronine decreases the activity of the proximal promoter (PII) of the aromatase gene in the mouse Sertoli cell line, TM4. *Mol Endocrinol*. 2003;17:923–934.
- Arambepola NK, Bunick D, Cooke PS. Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. *J Endocrinol*. 1998;156:43–50.
- Cooke PS. Thyroid hormones and testis development: a model system for increasing testis growth and sperm production. *Ann NY Acad Sci*. 1991;637:122–132.
- Cooke PS, Hess RA, Porcelli J, Meisami E. Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology*. 1991;129:244–248.
- Cooke PS, Zhao YD, Bunick D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod*. 1994;51:1000–1005.
- Holsberger DR, Kieseewetter SE, Cooke PS. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor  $\alpha 1$ . *Biol Reprod*. 2005;73:396–403.
- Holsberger DR, Cooke PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res*. 2005;322:133–140.
- Laslett AL, Li LH, Jester WF Jr, Orth JM. Thyroid hormone down-regulates neural cell adhesion molecule expression and affects attachment of gonocytes in Sertoli cell-gonocyte cocultures. *Endocrinology*. 2000;141:1633–1641.
- Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol*. 2008;199:351–365.
- Gilleron J, Nebout M, Scarabelli L, et al. A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of Sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol*. 2006;209:153–161.
- Brehm R, Zeiler M, Rüttinger C, et al. A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol*. 2007;171:19–31.
- de Montgolfier B, Dufresne J, Letourneau M, et al. The expression of multiple connexins throughout spermatogenesis in the rainbow trout testis suggests a role for complex intercellular communication. *Biol Reprod*. 2007;76:2–8.
- de Montgolfier B, Faye A, Audet C, Cyr DG. Seasonal variations in testicular connexin levels and their regulation in the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Gen Comp Endocrinol*. 2009;162:276–285.
- Mendis-Handagama SM, Siril Ariyaratne HB. Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. *Indian J Exp Biol*. 2005;43:939–962.
- Antony FF, Aruldas MM, Udhayakumar RC, Maran RR, Govindarajulu P. Inhibition of Leydig cell activity in vivo and in vitro in hypothyroid rats. *J Endocrinol*. 1995;144:293–300.
- Marlatt VL, Gerrie E, Wiens S, Jackson F, Moon TW, Trudeau VL. Estradiol and triiodothyronine differentially modulate reproductive and thyroidal genes in male goldfish. *Fish Physiol Biochem*. 2012;38:283–296.
- Schulz RW, de Franca LR, Lareyre JJ, et al. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol*. 2010;165:390–411.
- Schulz RW, Menting S, Bogerd J, Franca LR, Vilela DA, Godinho HP. Sertoli cell proliferation in the adult testis—evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod*. 2005;73:891–898.
- Leal MC, Cardoso ER, Nóbrega RH, et al. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with

- an emphasis on spermatogonial generations. *Biol Reprod.* 2009;81:177–187.
26. Batlouni SR, Nóbrega RH, Franca LR. Cell junctions in fish seminiferous epithelium. *Fish Physiol Biochem.* 2009;35:207–217.
  27. Russell 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. *Am J Anat.* 1989;184:179–189.
  28. Loir M, Sourdain P, Mendis-Handagama SM, Jégou B. Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc Res Tech.* 1995;32:533–552.
  29. Leal MC, de Waal PP, García-López A, Chen SX, Bogerd J, Schulz RW. Zebrafish primary testis tissue culture: an approach to study testis function *ex vivo*. *Gen Comp Endocrinol.* 2009;162:134–138.
  30. Froment P, Vigier M, Nègre D, et al. Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. *J Endocrinol.* 2007;194:557–568.
  31. Irwin DA, Van Der Kraak G. Regulation and actions of insulin-like growth factors in the ovary of zebrafish (*Danio rerio*). *Gen Comp Endocrinol.* 2012;177:187–194.
  32. de Waal PP, Wang DS, Nijenhuis WA, Schulz RW, Bogerd J. Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (*Danio rerio*) testis. *Reproduction.* 2008;136:225–234.
  33. Bogerd J, Blomenröhr M, Andersson E, et al. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod.* 2001;64:1633–1643.
  34. Vischer HF, Teves AC, Ackermans JC, van Dijk W, Schulz RW, Bogerd J. Cloning and spatiotemporal expression of the follicle-stimulating hormone  $\beta$  subunit complementary DNA in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol Reprod.* 2003;68:1324–1332.
  35. Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed. Eugene, OR: University of Oregon; 2000.
  36. Wang DS, Jiao B, Hu C, Huang X, Liu Z, Cheng CH. Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367:336–341.
  37. García-López A, de Jonge H, Nóbrega RH, et al. Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins. *Endocrinology.* 2010;151:2349–2360.
  38. Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod.* 2000;62:664–669.
  39. Singh R, Hamada AJ, Agarwal A. Thyroid hormones in male reproduction and fertility. *Open Reprod Sci J.* 2011;3:98–104.
  40. Chen SX, Almeida FF, Andersson E, et al. Cloning, pharmacological characterization and expression analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) nuclear progesterone receptor. *Gen Comp Endocrinol.* 2012;179:71–77.
  41. Ohta T, Miyake H, Miura C, Kamei H, Aida K, Miura T. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol Reprod.* 2007;77:970–977.
  42. Rao JN, Liang JY, Chakraborti P, Feng P. Effect of thyroid hormone on the development and gene expression of hormone receptors in rat testes *in vivo*. *J Endocrinol Invest.* 2003;26:435–443.
  43. Canale D, Agostini M, Giorgilli G, et al. Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. *J Androl.* 2001;22:284–288.
  44. Sahoo DK, Roy A, Bhanja S, Chainy GB. Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation. *Gen Comp Endocrinol.* 2008;156:63–70.
  45. de Waal P. *Hormonal Regulation of Spermatogenesis in Zebrafish* [PhD thesis]. 2009. ISSN 978.90.393.5143.7:105–131.
  46. Nobrega RH, Greebe CD, van de Kant H, Bogerd J, de Franca LR, Schulz RW. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS One.* 2010;5(9).
  47. Palmero S, Prati M, Barreca A, Minuto F, Giordano G, Fugassa E. Thyroid hormone stimulates the production of insulin-like growth factor I (IGF-I) by immature rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1990;68:61–65.
  48. 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.* 2003;68:1232–1240.
  49. Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D. p19Sklp1 and p45Sklp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell.* 1995;82:915–925.
  50. Sridharan S, Simon L, Meling DD, et al. Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod.* 2007;76:804–812.
  51. Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;246:121–127.
  52. Cyr DG, Eales JG. *In vitro* effects of thyroid hormones on gonadotropin-induced estradiol-17  $\beta$  secretion by ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol.* 1988;69:80–87.
  53. Ariyaratne HB, Mills N, Mason JI, Mendis-Handagama SM. Effects of thyroid hormone on Leydig cell regeneration in the adult rat following ethane dimethane sulphonate treatment. *Biol Reprod.* 2000;63:1115–1123.
  54. García-López A, Bogerd J, Granneman JC, et al. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology.* 2009;150:357–365.
  55. Planas JV, Swanson P, Dickhoff WW. Regulation of testicular steroid production *in vitro* by gonadotropins (GTH I and GTH II) and cyclic AMP in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol.* 1993;91:8–24.
  56. Flood DE, Fernandino JI, Langlois VS. Thyroid hormones in male reproductive development: evidence for direct crosstalk between the androgen and thyroid hormone axes. *Gen Comp Endocrinol.* In press.
  57. Swapna I, Rajasekhar M, Supriya A, et al. Thiourea-induced thyroid hormone depletion impairs testicular recrudescence in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2006;144:1–10.
  58. Orth JM. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec.* 1982;203:485–492.
  59. Joyce KL, Porcelli J, Cooke PS. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *J Androl.* 1993;14:448–455.
  60. Schulz RW, van Dijk W, Chaves-Pozo E, García-López A, de Franca LR, Bogerd J. Sertoli cell proliferation in the adult testis is induced by unilateral gonadectomy in African catfish. *Gen Comp Endocrinol.* 2012;177:160–167.
  61. Pitetti JL, Calvel P, Zimmermann C, et al. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cells proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol Endocrinol.* 2013;27:814–827.
  62. Le Gac F, Loir M, le Bail PY, Ollitrault M. Insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol Reprod Dev.* 1996;44:23–35.
  63. Matta SL, Vilela DA, Godinho HP, França LR. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology.* 2002;143:970–978.
  64. Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese

- eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:5774–5778.
65. Verhoeven G, Willems A, Denolet E, Swinnen JV, De Gendt K.

Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010;365:1537–1556.