

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR**

**Estudo comparado da função testicular de camundongos adultos  
BALB/c selvagens e portadores de mutação nos genes *Foxn1* e *Prkdc***

Mestranda: Carolina Felipe Alves de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Gleide Fernandes Avelar

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Renato de França

BELO HORIZONTE

2014

**Carolina Felipe Alves de Oliveira**

Estudo comparado da função testicular de camundongos adultos BALB/c selvagens e portadores de mutação nos genes *Foxn1* e *Prkdc*

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

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Gleide Fernandes Avelar

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Renato de França

BELO HORIZONTE

2014

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que me permitiu entender um pouco mais sobre a perfeição e equilíbrio da natureza;

À minha orientadora Gleide Fernandes Avelar pelo exemplo de pesquisadora e pessoa e acima de tudo pela valiosa amizade;

Ao coorientador Luiz Renato de França pela oportunidade, por todos os ensinamentos, e orientação;

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular pelo aprendizado, ajuda e momentos de descontração;

À Samyra Nassif pela ajuda valiosa no Real Time;

Ao professor Rodrigo Resende Ribeiro e todos do Laboratório de Imunologia e Bioquímica por gentilmente disponibilizarem a infra-estrutura de seu laboratório e pela ajuda no Real time;

Ao Pedro pelo amor, pelo companheirismo e acima de tudo compreensão apesar da distância;

Aos meus pais - Pedro e Débora - pelo carinho e exemplo de vida; e irmãos - Renato e Pedro - por me fazerem mais feliz.

A todos os professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular;

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG.

**Muito obrigada!**

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

*Cora Coralina*

## RESUMO

O desenvolvimento de novas tecnologias para reproduzir animais mutantes fornece excelentes oportunidades para melhor compreender a biologia reprodutiva. Os camundongos *nude* e *scid* apresentam, respectivamente, mutações nos genes *Foxn1* e *Prkdc*. Ambos apresentam um fenótipo imunodeficientes e por esta razão são modelos experimentais muito atrativos para diversos tipos de estudos e experimentos, incluindo-se oncologia e abordagens envolvendo transplantes e enxertos de órgãos e/ou tecidos. Camundongos *nude* são atímicos e deficientes em linfócitos T, além de possuírem níveis reduzidos de gonadotrofinas (LH e FSH) e testosterona. Os camundongos *scid* são deficientes em linfócitos T e B e altamente susceptíveis a infecções, além de apresentarem aumento na apoptose de espermatócitos primários na fase de paquíteno em comparação aos selvagens. Apesar de escassa, a literatura disponível sobre a biologia reprodutiva de camundongos machos *nude* e *scid* indica alterações na espermatogênese. Desta forma, no presente estudo, buscamos investigar de maneira mais detalhada a função testicular de camundongos BALB/c *nude* e *scid* em comparação ao fenótipo selvagem, utilizando-se parâmetros qualitativos e quantitativos. Diferenças significativas foram encontradas em diversos parâmetros investigados. Assim, o menor peso testicular dos camundongos *nude* determinou o menor índice gonadossomático em relação às demais linhagens. Seguindo uma tendência já relatada na literatura, a linhagem *nude* apresentou maior diâmetro tubular e, conseqüentemente, menor comprimento total de túbulo seminífero por testículo e por grama de testículo. Diferenças quanto à distribuição da frequência de diversos (I, II-III, V-VII, X e XII) estádios do ciclo do epitélio seminífero foram encontradas entre as três linhagens. Entretanto, a combinação das frequências tomando como referência a ocorrência da meiose, revelou que a fase meiótica estava estendida em camundongos *nude* em comparação com os selvagens. A célula de Leydig foi o componente testicular cujos parâmetros foram mais influenciados pelos fenótipos imunodeficientes, particularmente em *nude*. Assim, os números encontrados para esta célula esteroidogênica, por grama de testículo, foram 92 e 122 milhões em *scid* e *nude*, respectivamente. O número de células de Sertoli por testículo apresentou correlação positiva e significativa com a produção espermática diária por testículo nas três linhagens estudadas. Contudo, a eficiência espermatogênica foi significativamente maior em *scid* (~44 milhões de células por grama de testículo). O índice meiótico mostrou que a linhagem *scid* apresenta cerca de

48% de perdas ao longo do processo espermatogênico ( $p < 0,05$ ), seguido pelas linhagens selvagem (43%) e *nude* (38%). Maior ( $p < 0,05$ ) expressão relativa de mRNA para o receptor de andrógeno foi encontrada nos fenótipos imunodeficientes e as células de Leydig destas mesmas linhagens apresentaram marcação imunohistoquímica mais forte em comparação com o selvagem ( $p < 0,05$ ). Em *nude* e *scid* o conteúdo de mRNA da enzima esteroidogênica 3beta-HSD foi respectivamente, cerca de ~50 e 25 vezes maior ( $p < 0,05$ ) que no fenótipo selvagem. A avaliação de pixels demonstrou que a intensidade de marcação para a 3beta-HSD foi maior ( $p < 0,05$ ) em *nude*. Também na linhagem *nude* foi maior o conteúdo de mRNA da aromatase ( $p < 0,05$ ), embora a quantificação não tenha revelado diferenças quanto a intensidade da imunomarcação. A proteína Foxn1 foi identificada no citoplasma e núcleo das células de Leydig nas linhagens selvagem e *scid*, embora ausente no núcleo destas células em *nude*. DNA-PKc apresentou distribuição citoplasmática nas células de Leydig e de Sertoli em selvagem, *nude* e também em *scid*. Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo demonstraram que as linhagens imunodeficientes *nude* e *scid* apresentam características testiculares que as tornam modelos importantes para se investigar os mecanismos de regulação do testículo, particularmente aqueles envolvendo a proliferação das células de Sertoli e Leydig.

**Palavras-chave:** Genes *Foxn1* e *Prkdc*, espermatogênese, células de Sertoli, células de Leydig.

## ABSTRACT

The development of new technologies to produce mutant animals provides excellent opportunities to better understand reproductive biology. Nude and scid mice have mutations in *Foxn1* e *Prkdc* genes. Both present an immunodeficient phenotype therefore are very attractive experimental models for several studies and experiments, including oncology and approaches involving organs and tissues transplants and grafts. Nude mice are athimic and T cells deficient, besides having lower levels of gonadotropins (LH and FSH) and testosterone. Scid mice are deficient in T and B cells and highly susceptible to infections, besides having an increase in pachytene spermatocytes apoptosis in comparison to the wild type. Although scarce, literature available about nude and scid male mice reproductive biology indicates changes in spermatogenesis. Therefore, in the present study, we aimed to investigate the testicular function of BALB/c nude and scid in a more detailed way in comparison to the wild type using qualitative and quantitative parameters. Significant differences were found for several parameters investigated. Thus, the lower testicular weight in nude mice determined its lower gonadosomatic index in comparison to the other strains. Following a trend already reported in the literature, nude strain presented a higher tubular diameter and, hence, a lower total tubular length per testis and per gram of testis. Differences in the frequency of several stages (I, II-III, V-VII, X e XII) of the seminiferous epithelium cycle were found among the three strains. However, the combination of the frequencies, taking the occurrence of the meiosis as a reference, revealed that the meiotic phase was bigger in nude mice in comparison to the wild type. The Leydig cell was the testicular element whose parameters were more influenced by the immunodeficient phenotype, particularly in nude. Therefore, the numbers found for this steroidogenic cell were 92 and 122 million per gram of testis for nude and scid mice. The Sertoli cell number per testis had a positive and significant correlation with the daily sperm production per testis in the three strains investigated. On the other hand, the spermatogenic efficiency was significantly higher in scid (~44 million of cells per gram of testis). The meiotic index showed that scid strain presents around 48% of losses along the spermatogenic process ( $p < 0,05$ ), followed by the wild type (43%) and nude (38%). Higher ( $p < 0,05$ ) relative mRNA expression for the androgen receptor was found for the immunodeficient phenotypes and the Leydig cells from these strains presented stronger immunohistochemistry labelling in comparison to the wild type ( $p < 0,05$ ). In nude and

scid, the 3 beta-HSD steroidogenic enzyme mRNA content was around ~50 and 25 times higher ( $p < 0,05$ ) in comparison to the wild type. The pixels evaluation showed that the labelling intensity for 3beta-HSD was higher in nude ( $p < 0,05$ ). Also the mRNA content of aromatase was higher in nude mice ( $p < 0,05$ ), although the quantification did not reveal any differences in immunolabelling intensity. Foxn1 protein was identified in the cytoplasm and nucleus of Leydig cells in wild type and scid mice, although it was absent in nude Leydig cells nucleus. DNA-PKc presented a cytoplasmic distribution in Leydig and Sertoli cells in wild type, nude and scid. Taking together, the data obtained in the present study demonstrated that the immunodeficient nude and scid strains presented testicular features that make them important models to investigate the regulation mechanisms of the testis, particularly those involved in Sertoli and Leydig cells proliferation.

**Key-words:** *Foxn1* and *Prkdc* genes, spermatogenesis, Sertoli cells, Leydig cells.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eixo hipotálamo-adenohipófise-testículo. ....	18
Figura 2: Vias da biossíntese de esteroides nas células de Leydig. ....	19
Figura 3: Frequência de estádios do CES classificados de acordo com o método do sistema acrossômico .....	42
Figura 4: Frequências dos estádios do CES agrupados em fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica .....	43
Figura 5: Produção espermática diária por testículo e por grama de testículo .....	46
Figura 6: Número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo .....	47
Figura 7: Quantificação da expressão do mRNA do receptor de andrógenos e das enzimas 3beta HSD e aromatase .....	48
Figura 8: Imunohistoquímica para o receptor de andrógenos .....	50
Figura 9: Quantificação da expressão do receptor de andrógenos .....	51
Figura 10: Imunohistoquímica para o receptor de hormônio luteinizante.....	52
Figura 11: Imunohistoquímica para as enzimas esteroideogênicas 3beta-HSD e aromatase .....	54
Figura 12: Quantificação por pixels da expressão das enzimas 3beta-HSD e aromatase nas células de Leydig.....	55
Figura 13: Distribuição do fator de transcrição Foxn1 em testículos de camundongos BALB/c selvagem, <i>nude</i> e <i>scid</i> .....	56
Figura 14: Identificação da proteína DNA-PKc em testículos de camundongos BALB/c selvagem, <i>nude</i> e <i>scid</i> .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> usados para estudos de expressão gênica.....	36
Tabela 2: Detalhamento do programa de qPCR usado para quantificação da expressão gênica.....	37
Tabela 3: Dados biométricos de camundongos machos BALB/c selvagem, <i>nude</i> e <i>scid</i> . .....	39
Tabela 4: Histometria dos testículos de camundongos BALB/c selvagens, <i>nude</i> e <i>scid</i> .	41
Tabela 5: Números corrigidos de células germinativas e nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulos seminíferos no estágio VII do CES de camundongos BALB/c selvagens, <i>nude</i> e <i>scid</i> .....	44
Tabela 6: Razões entre números celulares corrigidos, obtidos no estágio VII do CES em camundongos BALB/c selvagens, <i>nude</i> e <i>scid</i> .....	45
Tabela 7: Números de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo em camundongos BALB/c selvagens, <i>nude</i> e <i>scid</i> .....	45
Tabela 8: Parâmetros de células de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ) em camundongos selvagens, <i>nude</i> e <i>scid</i> da linhagem BALB/c.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

3Beta-HSD - 3- $\beta$ -hydroxisteroide desidrogenase

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

CES – Ciclo do epitélio seminífero

CL – Célula de Leydig

CS – Célula de Sertoli

DAB - Diaminobenzidina

DEPC: Dietilpirocarbonato

DHT – Diidrotestosterona

DNA-PK - Proteína quinase ativada por DNA

DNA-PKc – Subunidade catalítica da proteína quinase ativada por DNA

dNTP: Desoxi (nucleotídeo) 5'-trifosfato

EPM- Erro padrão da média

FSH – Hormônio folículo estimulante

GH – Hormônio do crescimento

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

IGS – Índice gonadossomático

LH – Hormônio luteinizante

M-MuLV: Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro

NHEJ – Junção de extremidade não homóloga

PCR: Reação em cadeia da polimerase

qPCR – PCR quantitativa ou PCR em tempo real

SCID – Imunodeficiência severa combinada

SPG A – Espermatogônia A

StAR – Proteína reguladora da esteroidogênese aguda

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA .....	15
1.1. ESTRUTURA TESTICULAR EM MAMÍFEROS .....	15
1.2. ESPERMATOGÊNESE EM MAMÍFEROS .....	16
1.3. CÉLULAS DE LEYDIG .....	17
1.4. CÉLULAS DE SERTOLI .....	19
1.5. CAMUNDONGOS PORTADORES DA MUTAÇÃO NO GENE <i>Foxn1</i> .....	21
1.5.1. Gene <i>Foxn1</i> .....	21
1.5.2. Camundongos <i>nude</i> .....	22
1.5.3. Aspectos reprodutivos em camundongos <i>nude</i> .....	23
1.6. CAMUNDONGOS PORTADORES DA MUTAÇÃO NO GENE <i>Prkdc</i> .....	24
1.6.1. Gene <i>Prkdc</i> .....	24
1.6.2. Camundongos <i>scid</i> .....	25
1.6.3. Aspectos reprodutivos em camundongos <i>scid</i> .....	26
2. JUSTIFICATIVA .....	27
3. OBJETIVOS .....	28
3.1. OBJETIVOS GERAIS .....	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	30
4.2. COLETA E PROCESSAMENTO DOS TESTÍCULOS .....	30
4.3. ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA DE ESTÁDIOS DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO .....	31
4.4. MORFOMETRIA DOS COMPONENTES TESTICULARES .....	31
4.4.1. Diâmetro tubular .....	31

4.4.2. Proporção volumétrica (%) e volume dos componentes do testículo .....	31
4.4.3. Comprimento total dos túbulos seminíferos .....	32
4.4.4. Contagem do número de células germinativas e de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII do CES.....	32
4.4.5. Razões entre números celulares .....	33
4.4.6. População de células de Sertoli por testículo.....	33
4.4.7. Proporção núcleo/citoplasma, diâmetro nuclear e número das células de Leydig	34
4.4.8. Produção espermática diária por testículo e por grama de testículo.....	34
4.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR .....	35
4.6. IMUNOHISTOQUÍMICA.....	37
4.6.1. Quantificação da expressão imunohistoquímica.....	38
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
5. RESULTADOS .....	39
5.1. PESO CORPORAL, TESTICULAR E ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO .....	39
5.2. MORFOMETRIA DO TESTÍCULO .....	39
5.3. FREQUÊNCIA DE ESTÁDIOS .....	42
5.4. CONTAGENS CELULARES E QUANTIFICAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE .....	44
5.4.1. Populações e Razões celulares .....	44
5.4.2. Número de Células de Sertoli e Produção Espermática Diária .....	45
5.5 MORFOMETRIA DAS CÉLULAS DE LEYDIG .....	46
5.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR .....	47
5.7. IMUNOHISTOQUÍMICA.....	49

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	58
9. REFERÊNCIAS .....	66

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. ESTRUTURA TESTICULAR EM MAMÍFEROS

O testículo dos mamíferos eutérios é um órgão com forma arredondada ou ovóide, com função anfícina (endócrina e exócrina) e que se localiza no escroto, envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, a túnica albugínea, que emite septos para o interior do órgão delimitando os lóbulos testiculares. O parênquima testicular pode ser morfofuncionalmente dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intersticial (intertubular) e o compartimento dos túbulos seminíferos (tubular). No primeiro, estão localizadas as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo e outros tipos celulares como macrófagos e mastócitos (Russell et al., 1990). O compartimento tubular constitui a maior parte do testículo, ocupando, na maioria dos mamíferos, entre 70 e 95% do parênquima deste órgão (França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). Os túbulos seminíferos são compostos por túnica própria, lume e epitélio seminífero. A túnica própria é constituída de matriz extracelular e células peritubulares mióides, que são contráteis e auxiliam na propulsão dos espermatozóides e de fluido através dos túbulos (Russell et al., 1990). O epitélio seminífero é composto pelas células de Sertoli e pelas células germinativas, estas últimas em diferentes estágios de diferenciação. A região central dos túbulos compreende o lume tubular resultante da secreção de fluido pelas células de Sertoli sob a influência dos andrógenos, particularmente a testosterona. Este fluido é responsável por carrear os espermatozóides espermiados e ainda imóveis através de parte dos ductos excurrentes (*rete testis*, ductulos eferentes e ducto epididimário).

## **1.2. ESPERMATOGÊNESE EM MAMÍFEROS**

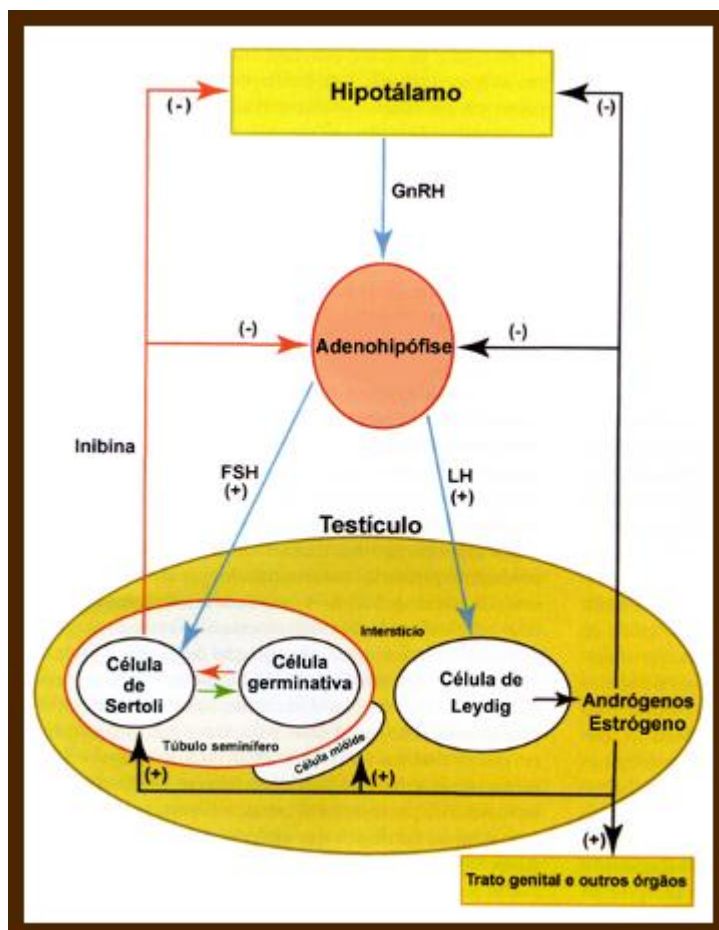
A espermatogênese é um processo cíclico, altamente complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos, no qual espermatogônias diplóides se dividem e se diferenciam para dar origem a espermatozóides maduros. Esse processo dura cerca de 40 a 60 dias na maioria das espécies de mamíferos já investigadas (França & Russell, 1998; França et al., 1998; Godinho, 1999, Hess & França, 2007). Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: (a) fase proliferativa ou espermatogonial, caracterizada por várias e sucessivas divisões mitóticas dos diferentes tipos de espermatogônias; (b) fase meiótica/espermatocitária, na qual ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e duas divisões meióticas (reducional/equacional) que resultam na formação de uma célula haplóide denominada espermátide; e (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde as espermátides arredondadas passam por drásticas alterações morfológicas e funcionais tais como a formação do acrossoma, do flagelo e a condensação nuclear, resultando numa célula altamente especializada, o espermatozóide, o qual, após passar pelo epidídimo, estará apto para a fertilização (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994).

As células germinativas se organizam nos túbulos seminíferos em associações celulares definidas como estádios, os quais se sucedem com o tempo de maneira ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero (Russell et al., 1990). Cada tipo celular em um determinado estádio está funcionalmente associado a todos os outros tipos celulares presentes naquele mesmo estádio. A duração de cada ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica considerada espécie-específica (Clermont, 1972) e está sob controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). Os estádios do ciclo podem ser classificados pelo método da morfologia tubular (Berndtson, 1977; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007) e pelo método do sistema acrossômico (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990; Hess & França, 2007). No primeiro caso, oito estádios do ciclo são sempre obtidos para todas as espécies e se baseia na forma e localização do núcleo da espermátide bem como a presença de figuras de meiose (Roosen-Runge & Giesel Jr., 1950; Courot et al., 1970; Ortavant et al., 1977). Já pelo sistema acrossômico, o número de estádios varia de seis a quatorze nas espécies já investigadas, e a identificação dos mesmos se dá pelo desenvolvimento do acrossoma nas espermátides (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998; França et al., 1999; Hess & França, 2007). Particularmente em camundongos, foram caracterizados doze estádios pelo sistema acrossômico (Russell et al., 1990).



### 1.3. CÉLULAS DE LEYDIG

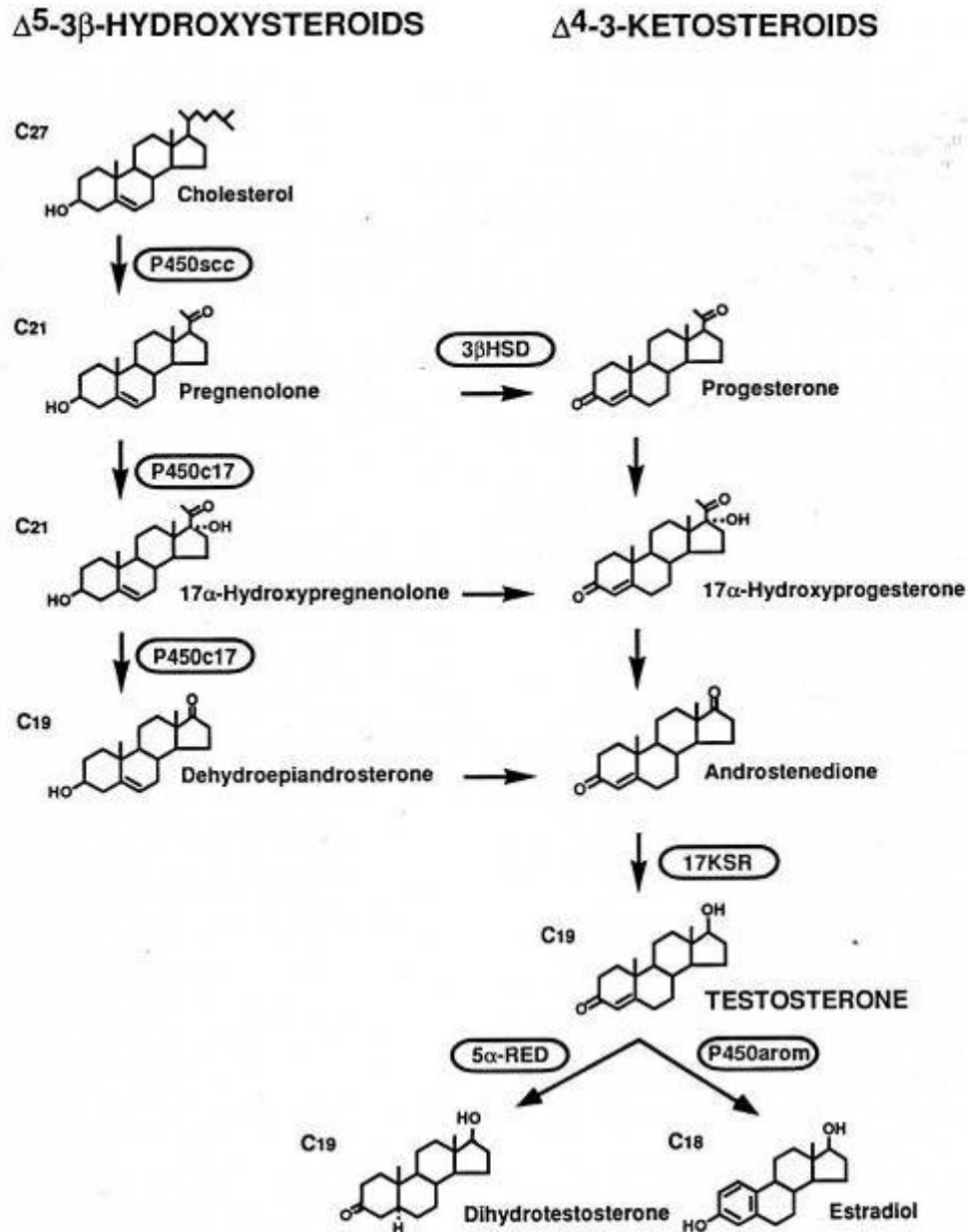
De maneira geral, a célula de Leydig é o componente mais abundante do compartimento intertubular (Russell et al., 1990), sendo esta célula bastante conhecida por sua marcante produção de andrógenos a partir de uma molécula base, o colesterol (Bardin, 1996). A sua ultra-estrutura evidencia a atividade esteroidogênica deste tipo celular a partir da visualização do retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, numerosas gotículas lipídicas e mitocôndrias com cristas tubulares (Russell et al., 1996). A produção dos hormônios esteroides ocorre através de estímulos do LH (hormônio luteinizante) em receptores localizados na membrana citoplasmática das células de Leydig. Hormônio este que é uma glicoproteína sintetizada e secretada na adenohipófise, sob a influência do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) proveniente do hipotálamo. O controle de retroalimentação negativo do LH é exercido pela testosterona tanto na adenohipófise quanto no hipotálamo (Shupnik & Schreihof, 1997) (figura 1). Os andrógenos atuam na diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelliniemi et al., 1996), nas células peritubulares mióides da túnica própria dos túbulos seminíferos e nas células de Sertoli, estimulando a produção de numerosos fatores importantes para as células espermatogênicas. Além disso, os andrógenos são responsáveis pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e manutenção quantitativa da espermatogênese (Sharpe, 1994; Zirkin et al., 1994; De Gendt et al., 2004).



**Figura 1:** Eixo hipotálamo-adenohipófise-testículo. Efeito estimulatório (+) e inibitório (-). (França & Chiarini-Garcia, 2005 – adaptado).

A síntese de testosterona se dá a partir do colesterol, captado da corrente sanguínea e é, portanto, precedida pela translocação desse colesterol para a membrana interna da mitocôndria pela proteína reguladora da esteroidogênese aguda (StAR). Essa proteína é expressa nas adrenais e gônadas e sua produção é induzida pelo LH. A via esteroidogênica se inicia na mitocôndria com a conversão do colesterol em pregnenolona envolvendo o citocromo P450. Os passos seguintes da via esteroidogênica ocorrem no retículo endoplasmático liso. A partir da formação da pregnenolona, existem duas vias paralelas. Na primeira, a enzima 3beta-HSD converte a pregnenolona em progesterona. Na segunda, a enzima 17alfa-hidroxilase converte a pregnenolona em 17-OH-pregnenolona. As duas vias levam à produção de testosterona. Após sua síntese, a testosterona é liberada e cai na corrente sanguínea atingindo os órgãos periféricos. Na maioria das células-alvo a testosterona é convertida em diidrotestosterona (DHT) pela 5alfa-redutase. A DHT apresenta maior afinidade pelo receptor do que a testosterona, sendo assim um potente andrógeno. Além disso, é possível a formação de estrógenos a

partir da testosterona ou de seu precursor androstenediona por meio da ação da enzima aromatase (Colleta & Carvalho, 2005) (figura 2).



**Figura 2:** Vias da biossíntese de esteroides nas células de Leydig. P450scc – citocromo P450 side-chain cleavage. P450c17 – citocromo P450 17alfa hidroxilase/C17-20 liase. 3 $\beta$ HSD – 3beta hidrixiesteroide desidrogenase. 17KSR – 17 cetosteroide redutase (17beta hidroxiesteroide desidrogenase). P450arom – citocromo P450 aromatase. 5 $\alpha$ -RED – 5alfa redutase. (Payne & O’Shaughnessy, 1996).

#### 1.4. CÉLULAS DE SERTOLI

A célula de Sertoli é um elemento-chave da espermatogênese e, durante este processo, interage com as células germinativas de maneira bastante complexa, tanto

física quanto bioquimicamente. As junções de oclusão entre células de Sertoli adjacentes dividem o epitélio seminífero em compartimentos basal e adluminal (Russell & Griswold, 1993). No compartimento basal estão localizadas as espermatogônias e espermatócitos primários iniciais (pré-leptótenos/leptótenos), enquanto no adluminal encontram-se os espermatócitos primários a partir de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Funcionalmente, as junções de oclusão compõem a barreira de células de Sertoli que propicia um microambiente específico e imunoprivilegiado, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Russell & Griswold, 1993). Assim, fica bastante evidente a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, Leydig e peritubulares mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Russell et al., 1994; França & Russell, 1998; Welsh et al., 2009).

Além da formação da barreira, as células de Sertoli desempenham outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas, como o fornecimento de nutrientes e inúmeros outros fatores importantes, suporte físico (sustentação) para as células espermatogênicas, fagocitose do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da liberação das células espermiadas bem como das células germinativas que sofrem apoptose, além de importante função de intermediação hormonal na espermatogênese através de receptores para esteroides (andrógenos e estrógenos) e para FSH (Griswold, 1993; Zirkin et al., 1994; O'Shaughnessy, 2014). As células de Sertoli participam ainda ativamente no processo de espermição das espermátides para o lume tubular, além de serem responsáveis pela secreção de fluido, o qual possui substâncias importantes para a função epididimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozóides.

Em camundongos, assim como na maioria dos mamíferos já investigados, as células de Sertoli proliferam ativamente durante o período fetal e pré-púbere (Orth, 1984; Orth, 1993; McCoard et al., 2003). Porém, os mecanismos regulatórios responsáveis por esta proliferação na fase fetal são até agora pouco conhecidos, sendo, pelo menos em camundongos, independentes de gonadotrofinas (Baker & O'Shaughnessy, 2001). No entanto, durante o período pós-natal, o FSH é o principal fator responsável pela proliferação das células de Sertoli (Orth, 1984; Orth, 1993; Heckert & Griswold, 2002). Evidências na literatura indicam que os andrógenos são também importantes na determinação do número de células de Sertoli tanto na fase fetal

(Scott et al., 2007, 2008; Auharek et al., 2012) quanto no período pós-natal (Sharpe et al., 2003; Johnston et al., 2004; Atanassova et al., 2005; Auharek & França, 2010). Devido ao fato de cada célula de Sertoli suportar um número limitado de células germinativas, o número total destas células, que é estabelecido durante o período proliferativo, determina o tamanho do testículo e o número final de espermatozoides produzidos e, de maneira geral, a eficiência espermática (França et al., 2000; Cooke et al., 2005; Leal e França, 2009).

Assim como o LH, o FSH é sintetizado na adenohipófise sob o estímulo do GnRH (hipotálamo) e atua nas células de Sertoli maduras estimulando a secreção de substâncias importantes para o desenvolvimento da espermatogênese. Além disso, as células de Sertoli interagem com as células germinativas e produzem inibina, que atua diminuindo a produção de GnRH no hipotálamo e de FSH na adenohipófise.

Nos testículos de animais sexualmente maduros, as células de Sertoli estão completamente diferenciadas. A variação considerável na forma e estrutura da célula de Sertoli durante o ciclo do epitélio seminífero (CES) demonstra o alto grau de plasticidade desta célula, o que reflete as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas células germinativas (Russell *et al.*, 1993). Um exemplo claro dessa plasticidade é a variação na expressão dos receptores de andrógenos durante os estádios do ciclo do epitélio seminífero (Bremner *et al.*, 1994).

### 1.5. CAMUNDONGOS PORTADORES DA MUTAÇÃO NO GENE *Foxn1*

#### 1.5.1. Gene *Foxn1*

O gene *Foxn1*, cujo nome oficial é *forkhead box N1*, está localizado no cromossomo 11 em camundongos (Shultz et al., 1978; Byrd, 1993; Lisitsyn et al., 1994; Segre et al., 1995; Schorpp et al., 1997) e é composto por nove exons. Esse gene codifica o fator de transcrição Foxn1, da família winged helix/forkhead (Takahashi et al., 1992; Byrd, 1993; Nehls et al., 1994), cuja expressão foi encontrada especificamente para células epiteliais da pele (Brissette et al., 1996) e do timo (Nehls et al., 1996). A proteína Foxn1 compreende um domínio de ativação transcricional C-terminal (Brissette et al., 1996; Schüddekopf et al., 1996) e um domínio de ligação ao DNA (Schlake et al., 1997). A perda da função de um (ou dos dois) domínio(s) leva ao fenótipo *nude*. Os camundongos *nude* são portadores de mutação autossômica recessiva no gene *Foxn1*, sendo, portanto, animais homozigotos recessivos (*Foxn1*<sup>-/-</sup>). Essa

mutação consiste numa deleção de um par de bases (G) no exon 3, que leva à introdução de um *stop* códon prematuro. Sendo assim, é produzida uma proteína inativa.

### 1.5.2. Camundongos *nude*

A descrição da mutação no gene *Foxn1* se deu inicialmente por Flanagan (1966), em artigo no qual relatava suas observações da descoberta de uma linhagem de camundongo mutante espontâneo cujo fenótipo não possuía pelos no corpo (*nude*). Esse mutante espontâneo foi encontrado na colônia de animais de estoque albino proveniente do Virus Laboratory, Ruchill Hospital, Glasgow, UK. Com intuito de se estudar as características desses camundongos, as matrizes heterozigotas que deram origem ao mutante foram armazenadas e acasaladas, o que permitiu a criação de um estoque deste fenótipo *nude*. Flanagan observou que havia maior mortalidade nos animais sem pelos, o que foi posteriormente corroborado pela observação de que esses animais eram atímicos, apresentando deficiência de linfócitos T (Pantelouris, 1968). Outros estudos demonstraram que as duas características (alopecia e atimia) dos camundongos *nude* são resultado de mutação no mesmo gene (*Foxn1*), que apresenta efeitos pleiotrópicos (Eaton, 1976; Nehls et al., 1996).

Através de avaliação histológica da pele foi observado que esses camundongos apresentavam desenvolvimento normal dos folículos pilosos até o nascimento, mas a partir do dia 6 pós-natal, devido à queratinização anormal, os fios formados começavam a se enovelar no infundíbulo do folículo piloso, tornando-o dilatado e, assim, esses pelos não conseguiam penetrar a epiderme (Flanagan, 1966; Paus et al., 1999; Mecklenburg et al., 2001). Macroscopicamente os camundongos *nude* não possuem pelos, mas na verdade eles apresentam um defeito na exposição dos mesmos.

O fenótipo atímico em homozigotos se dá pela falha no desenvolvimento embrionário do timo. O timo rudimentar destes camundongos permanece pequeno e cístico (Cordier & Heremans, 1975). Esse fenótipo causa vários defeitos do sistema imune, incluindo-se população muito reduzida de linfócitos, que é composta quase que exclusivamente por células B. Assim, ocorre resposta deficiente a antígenos timo-dependentes, levando à ausência de rejeição a enxertos e transplantes e grande susceptibilidade a infecções (Gershwin et al., 1975; Pantelouris, 1973; Rygaard, 1973; Rygaard & Povlsen, 1974). No caso dos animais heterozigotos, há presença de pelos e o timo tem aproximadamente 50 a 80 por cento do tamanho dos homozigotos controles.

Uma vez que os camundongos homozigotos são altamente susceptíveis à infecções por um amplo espectro de patógenos, eles devem se mantidos isolados, num ambiente livre de contaminações. Sob essas condições, sua vida é prolongada, equivalendo às linhagens normais (Rygaard e Friis, 1974). Por outro lado, a ausência do timo e o conseqüente comprometimento do sistema imune, fazem desses animais importantes modelos experimentais usados em pesquisas em oncologia, crescimento de tumores, transplantes e imunologia, especialmente devido à não rejeição. Além disso, o fenótipo *nude* presente nos camundongos é comparável, fenotipicamente, à síndrome humana de DiGeorge, na qual não há presença de timo em recém-nascidos, levando a uma imunodeficiência (Gershwin, 1977). Nessa síndrome, ocorre uma deleção em um pequeno segmento do cromossomo 22.

### 1.5.3. Aspectos reprodutivos em camundongos *nude*

Existem poucas observações acerca da histologia testicular de camundongos atímicos congênitos na literatura. Shire e Pantelouris (1974) observaram a ocorrência de distúrbio de maturação das espermátides, enquanto Ruitenber e Berkvens (1977) e Rebar e colaboradores (1982) encontraram morfologia anormal do epitélio germinativo. Além disso, Masahiro e colaboradores (1997) também observaram degeneração de células germinativas. A fertilidade das fêmeas homozigotas é baixa, o que parece estar relacionado tanto ao atraso na produção de gametas no início da maturidade sexual (Alten & Groscurth, 1975) quanto ao comprometimento no desenvolvimento das glândulas mamárias nessa linhagem (Nagasawa & Yanai, 1977). Por isso, o sistema mais eficiente de reprodução usa machos homozigotos (*Foxn1*<sup>-/-</sup>) e fêmeas heterozigotas (*Foxn1*<sup>+/-</sup>) (Rygaard, 1974). Os filhotes homozigotos podem ser identificados 24 horas pós-parto pela falta ou deformidade das vibrissas.

Camundongos *nude* mantidos em ambiente livre de contaminações possuem, aparentemente, funções da glândula adrenal, da tireóide e gonadal normais e a função desses órgãos endócrinos é a mesma encontrada para os animais selvagens. Apesar dos níveis hipofisários de hormônio de crescimento (GH) serem menores nos camundongos *nude*, a função do GH parece ser mantida, a julgar por sua concentração plasmática e crescimento normal destes animais (Ohsawa et al., 1974). Por outro lado, estudos de Rebar e colaboradores (1982) mostraram que camundongos atímicos *nude* apresentam concentrações séricas de gonadotrofinas e testosterona reduzidas em comparação ao selvagem. Já Brüner e colaboradores (1986) encontraram que a síntese de esteroides é

normal em *nude*, mas seus níveis séricos são menores. O mesmo padrão pode ser observado em roedores timectomizados durante o período neonatal. Esses animais apresentam níveis reduzidos de gonadotropinas e testosterona em relação aos normais (Pierpaoli & Besedovsky, 1975).

Ainda neste cenário, existem fortes evidências da relação do timo como regulador do sistema neuroendócrino. Assim, foi observado que camundongos Swiss *nude* atímicos apresentavam função comprometida do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que poderia estar relacionada à falta de fatores tímicos (Daneva *et al*, 1995). Além disso, o fator tímico denominado timulina, produzido pelas células epiteliais do timo, parece possuir um papel fisiológico na comunicação timo-hipotálamo-hipófise. Isso foi constatado após a observação de que a terapia gênica, para reestabelecer a produção de timulina em camundongos fêmea *nude* recém-nascidos, prevenia os *déficits* nas concentrações séricas de LH e FSH, tipicamente encontrados nestes animais adultos (Goya *et al*, 2007). Por outro lado, a concentração de andrógenos parece modular o tamanho do timo em roedores, uma vez que dados da literatura mostram que animais castrados apresentam aumento do timo e a evidência dessa regulação é a expressão de receptores de andrógeno em células epiteliais do timo (Olsen *et al.*, 2001).

### 1.6. CAMUNDONGOS PORTADORES DA MUTAÇÃO NO GENE *Prkdc*

#### 1.6.1. Gene *Prkdc*

A proteína quinase ativada por DNA (DNA-PK) é composta por duas subunidades, uma catalítica (DNA-PKc) codificada pelo gene *Prkdc* e outra heterodimérica (Ku70/80) responsável pelo reconhecimento do DNA. Esta enzima (DNA-PK) atua no reparo de quebras de fita dupla de DNA. Para que possa atuar no reparo de quebra de fita dupla de DNA, a proteína DNA-PK necessita da ação das duas subunidades, sendo que a Ku70/80 atua reconhecendo as extremidades de DNA livres e recrutando a subunidade catalítica (DNA-PKc) que, após fosforilada, se torna ativa. Em seguida, as extremidades livres de DNA são processadas e ligadas novamente por um complexo protéico de reparo e a integridade do DNA é restaurada. Esse tipo de reparo é denominado junção de extremidades não-homólogas (NHEJ).

A enzima DNA-PK apresenta importante papel na recombinação dos segmentos variável (V), diversidade (D) e junção (J) dos genes de imunoglobulinas e de receptores de células T. Essa recombinação V(D)J é um processo que utiliza NHEJ para promover a diversidade do sistema imune. Uma vez que os camundongos *scid* não completam a



recombinação gênica V(D)J, as suas células T e B não se tornam maduras e, por isso, não desenvolvem as respostas imunes humoral e mediada por célula (Lieber et al., 1988; Lieber et al., 1989).

### 1.6.2. Camundongos *scid*

Imunodeficiência severa combinada (SCID) é uma síndrome que resulta na perda da imunidade por linfócitos T e B. Essa síndrome foi inicialmente reconhecida em crianças por volta de 1950, nas quais se observava o óbito entre um e dois anos após nascimento caso não recebessem transplante de medula óssea normal (Glanzmann & Riniker, 1950; Hitzig et al., 1958). Esta característica de imunodeficiência também foi identificada em equinos e caninos. Nestas espécies, os filhotes afetados apresentam uma sobrevida de apenas alguns meses após o nascimento (Perryman, 2004). O fenótipo SCID não é decorrente de uma doença genética única, mas consiste de um grupo de doenças que podem ter diversas causas: ligada ao cromossomo X (Gitlin et al., 1959; Puck, 1999), herança autossômica recessiva (Glanzmann & Riniker, 1950) ou, em algum casos, sem evidência de transmissão genética (Hitzig et al., 1958).

Camundongos *scid* foram identificados pela primeira vez por Bosma e colaboradores em 1983, a partir de um grupo de animais de linhagem BALB/c congênica (C.B-17). Em seguida, observou-se que esses camundongos eram severamente deficientes em linfócitos B e T e altamente susceptíveis a infecções por causa da sua inabilidade de gerar resposta imune antígeno-específica (Schuler et al., 1986; Lieber et al., 1988; Malynn et al., 1988; Blackwell et al., 1989; Lieber et al., 1989; Bosma & Carroll, 1991). Em 1989, Bosma e colaboradores concluíram que a condição observada nesses camundongos se dava devido à mutação recessiva no cromossomo 16, responsável pela atividade de uma enzima envolvida no reparo de DNA (DNA-PKc ou polipeptídeo catalítico da proteína quinase ativada por DNA).

Pelo fato de apresentarem imunodeficiência mais severa que os camundongos *nude*, os camundongos *scid* suportam melhor enxertos e transplantes de células, tecidos e tumores, funcionando como importantes modelos experimentais. Devido à sua imunodeficiência, esses camundongos devem ser mantidos em ambiente livre de patógenos e de infecções para ter sua expectativa de vida semelhante aos camundongos normais.

### **1.6.3. Aspectos reprodutivos em camundongos *scid***

A literatura disponível acerca dos aspectos reprodutivos de camundongos *scid* é bastante escassa. Apesar de serem considerados férteis, Hamer e colaboradores (2003) observaram que os camundongos *scid* apresentam aumento de apoptose de espermatócitos em paquíteno no estágio IV do CES. A susceptibilidade deste tipo celular nesta fase do ciclo está correlacionada com o ponto de checagem da meiose (Hamer et al., 2003; De Rooij & De Boer, 2003).

## 2. JUSTIFICATIVA

A caracterização de modelos experimentais é fundamental para a compreensão da biologia reprodutiva a fim de viabilizar a utilização dos mesmos para o estudo dos diferentes aspectos relacionados com a reprodução/espermatogênese.

Os camundongos mutantes para os genes *Foxn1*(*nude*) e *Prkdc* (*scid*) constituem modelos importantes e amplamente utilizados para diversos tipos de estudos e experimentos, particularmente em oncologia e abordagens envolvendo transplantes e enxertos de órgãos e/ou tecidos. Esta importância deve-se ao fato destes camundongos apresentarem fenótipo imunodeficiente, que embora por vias diferentes, resulta na subsequente ausência/diminuição da rejeição tecidual. No entanto, a literatura disponível sobre os aspectos reprodutivos de camundongos machos *nude* e *scid* é bastante escassa, embora haja evidências de alterações no perfil hormonal nos mutantes para o gene *Foxn1* e na espermatogênese nos indivíduos *Prkdc*<sup>-/-</sup> (Pierpaoli & Besedovsky, 1975; Hamer et al., 2003).

Desta forma, com a finalidade de ampliar o conhecimento acerca do testículo, particularmente da espermatogênese, destas importantes linhagens murinas no presente trabalho investigamos de maneira mais detalhada, a partir de um estudo comparado com animais de fenótipo selvagem, a função testicular de camundongos machos adultos BALB/c portadores das mutações nos genes *Foxn1* e *Prkdc*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente estudo é o de se caracterizar a estrutura e função testiculares de camundongos BALB/c *nude* e *scid*, comparativamente a camundongos selvagens, através de análises morfofuncionais, estereológicas e imunohistoquímicas, além da avaliação da expressão dos genes *Foxn1* (*nude*) e *Prkdc* (*scid*).

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter dados biométricos (peso corporal e peso testicular) dos animais avaliados, para subsequente determinação do índice gonadossomático (IGS).
- Avaliar por meio de morfometria os seguintes parâmetros testiculares de camundongos das três linhagens investigadas:
  - a. Frequência de estádios do CES classificados de acordo com o sistema acrossômico;
  - b. Diâmetros tubular e do lume tubular, bem como a altura do epitélio seminífero;
  - c. Proporção volumétrica dos componentes do compartimento tubular (epitélio seminífero, lume, túnica própria) e intertubular (vasos sanguíneos, espaço linfático, células de Leydig e tecido conjuntivo);
  - d. Proporção núcleo/citoplasma e diâmetro nuclear das células de Leydig;
  - e. Números celulares para o cálculo do: índice de células de Sertoli, coeficiente de mitoses espermatogoniais, índice meiótico, razões celulares (número de paquítenos/pré-leptótenos e número de pré-leptótenos/espermatogônias) e rendimento geral da espermatogênese;
  - f. Comprimento total de túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo, bem como a produção espermática diária por testículo e por grama de testículo;
  - g. Número de células de Sertoli e de Leydig por testículo e por grama de testículo;

## Objetivos

- Avaliar a expressão dos genes *Foxn1* e *Prkdc* nos testículos de camundongos BALB/c selvagens e portadores de mutação nesses genes por meio de imunohistoquímica.
- Avaliar através de imunohistoquímica a expressão dos receptores de LH e andrógeno e das enzimas esteroidogênicas aromatase e 3beta-HSD nos testículos dos camundongos das três linhagens investigadas.
- Quantificar a intensidade de marcação imunohistoquímica das células de Leydig por meio da avaliação da intensidade de pixels dos seguintes marcadores: receptor de andrógeno, 3beta-HSD e aromatase em camundongos selvagens e nas linhagens imunodeficientes.
- Quantificar por qPCR a expressão dos genes receptor de andrógeno, 3beta-HSD e aromatase em BALB/c selvagem, *Foxn1*<sup>-/-</sup> e *Prkdc*<sup>-/-</sup>.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Dezesseis camundongos machos, sexualmente maduros (70 dias), de cada uma das linhagens investigadas (BALB/c selvagem, BALB/c *nude* e BALB/c *scid*) foram utilizados conforme a distribuição que segue: nove animais foram destinados para análises morfométricas através de microscopia de luz, quatro para as análises imunohistoquímicas e três tiveram seus testículos coletados para avaliação da expressão gênica por qPCR. Os camundongos imunodeficientes foram mantidos em ambiente sem contaminações, em microisoladores com filtração de ar, e foram alimentados com rações e água autoclavados. Os procedimentos utilizados foram aqueles aprovados de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG, protocolo 123/2013).

### 4.2. COLETA E PROCESSAMENTO DOS TESTÍCULOS

Os três camundongos utilizados para avaliação da expressão gênica foram pesados, orquiectomizados e os testículos congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80 °C. Os demais animais (13) tiveram seus testículos fixados por perfusão intracardíaca. Com a finalidade de facilitar a lavagem do leito vascular, aproximadamente 15 minutos antes da perfusão os animais receberam heparina (0,1mL/100mg peso corporal). Em seguida, os camundongos foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de Tiopental sódico (Thiopentax®) 0,1mg/25g peso corporal. Após a abertura da cavidade torácica, um cateter (22G = 1mm) foi introduzido no ventrículo esquerdo e o leito vascular lavado com solução salina 0,9%, a uma pressão de aproximadamente 80mmHg. Após esta etapa foi feita a perfusão com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M (para análises morfométricas) ou Bouin (para imunohistoquímica), por aproximadamente 25 minutos. Os testículos foram então retirados, pesados e recortados em fragmentos de 1 a 2mm de espessura. Estes fragmentos foram re-fixados por imersão no mesmo tipo de fixador por mais 12 a 24 horas, a 4° C. Em seguida, os fragmentos testiculares foram desidratados em sequência crescente de álcoois e incluídos em glicol metacrilato para análises histomorfométricas ou paraplast para imunohistoquímica. Para as análises histomorfométricas, os cortes histológicos de 4µm de espessura foram obtidos no micrótomo rotativo Leica RM 2165 e posteriormente corados com azul de toluidina -

borato de sódio a 1%. Em seguida, as lâminas foram montadas com Entellan (Laboratório Merck) e analisadas em microscópio Olympus BX40.

### **4.3. ESTIMATIVA DA FREQUÊNCIA DE ESTÁDIOS DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO**

A frequência de estádios do ciclo do epitélio seminífero caracterizados de acordo com o método do sistema acrossômico (Russell, 1990) foi obtida a partir da contagem de 250 secções transversais por animal de túbulos seminíferos que apresentaram o contorno mais circular possível.

### **4.4. MORFOMETRIA DOS COMPONENTES TESTICULARES**

Todas as análises morfométricas que serão detalhadas nos próximos itens seguiram o mesmo padrão e metodologias previamente descritas por Neves et al., 2002; França & Godinho, 2003; Leal et al., 2004; Leal & França, 2006; Almeida et al., 2006; Costa, 2009; Silva, et al., 2010.

#### **4.4.1. Diâmetro tubular**

O diâmetro tubular e altura do epitélio por animal foram obtidos a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível. Estas medidas foram realizadas utilizando-se régua micrométrica adaptada a uma das oculares de 10x, em aumento final de 400x.

#### **4.4.2. Proporção volumétrica (%) e volume dos componentes do testículo**

As proporções volumétricas foram realizadas com o auxílio de retículo com 441 intersecções (pontos) acoplado a ocular no aumento de 400x. Foram analisados 15 campos escolhidos ao acaso, perfazendo-se um total de 6615 pontos. Os componentes testiculares avaliados no espaço tubular foram: epitélio seminífero, lume e túnica própria. Já no espaço intertubular as células de Leydig, vasos sanguíneos, espaços linfáticos e tecido conjuntivo foram os elementos avaliados. Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,03 a 1,04; França, 1991; França & Godinho, 2003), o peso líquido do testículo foi considerado igual ao seu volume. Para se obter medida mais precisa do volume testicular, o percentual equivalente da túnica albugínea (~3,5% em camundongos adultos) foi excluído do peso testicular. Assim, o volume de cada componente do testículo foi determinado como sendo o produto entre o percentual

ocupado pelo componente considerado e o volume do testículo, conforme fórmula abaixo:

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

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

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

X = percentual (%) ocupado pelo componente no testículo

#### **4.4.3. Comprimento total dos túbulos seminíferos**

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (Attal & Courot, 1963):

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

onde: VTS é o volume líquido dos túbulos seminíferos no testículo

$\pi R^2$  é a área da secção transversal de túbulos seminíferos

R é o raio, ou seja, diâmetro tubular dividido por 2

O comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo corresponde à razão entre o comprimento tubular total e o peso líquido do testículo.

#### **4.4.4. Contagem do número de células germinativas e de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII do CES**

Esta análise tem como principal objetivo fornecer dados para se investigar quantitativamente a evolução do processo espermatogênico através de índices ou razões celulares. As contagens dos diferentes tipos celulares investigados foram obtidas em 10 secções transversais de túbulos seminíferos, com perfis o mais arredondado possíveis, no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero e em aumento de 1000x. Os seguintes tipos celulares foram avaliados:

- Espermatócitos primários em paquíteno
- Espermátides arredondadas
- Nucléolo de célula de Sertoli

Todas as contagens obtidas para as células da linhagem espermatogênica foram corrigidas para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se



a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann & Almquist (1962), conforme segue:

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

Onde: DM = diâmetro nuclear médio

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

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

#### **4.4.5. Razões entre números celulares**

A partir das contagens celulares feitas no estágio VII para se estimar a eficiência do processo espermatogênico e da célula de Sertoli, foram calculadas as razões entre os números corrigidos de células espermatogênicas e entre estas últimas e as células de Sertoli. As seguintes razões baseadas nas contagens feitas no estágio VII foram obtidas:

- Espermatídes arredondadas/espermatócitos primários em paquíteno (índice meiótico)
- Espermatídes arredondadas/núcleolos de célula de Sertoli (eficiência da célula de Sertoli)

#### **4.4.6. População de células de Sertoli por testículo**

De posse do comprimento total dos túbulos seminíferos, do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli, e do valor da espessura do corte ( $\mu\text{m}$ ) pode-se estimar o número de células de Sertoli por testículo, conforme fórmula abaixo:

$$\text{NCS} = \frac{\text{CT} \times \text{N}^\circ \text{CS}}{\text{EC}}$$

Onde: NCS = número de células de Sertoli por testículo  
CT = comprimento total dos túbulos seminíferos ( $\mu\text{m}$ )  
N° CS = número corrigido de células de Sertoli por secção transversal  
EC = espessura do corte

Além disso, dividindo-se o valor obtido para o número de células de Sertoli por testículo pelo peso líquido testicular, obtém-se o número de células de Sertoli por grama por testículo.

#### **4.4.7. Proporção núcleo/citoplasma, diâmetro nuclear e número das células de Leydig**

As proporções núcleo/citoplasma de células de Leydig foram estimadas utilizando-se ocular com retículo com 441 intersecções (pontos) por campo, em aumento final de 1000x. Procurou-se obter um total de aproximadamente 1000 pontos por animal. O diâmetro nuclear por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 núcleos, utilizando-se aumento de 1000x.

A partir da proporção obtida e do diâmetro nuclear, foi possível estimar os volumes nuclear, citoplasmático e individual das células de Leydig:

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

Onde: R = Raio nuclear (diâmetro nuclear / 2)

$$\pi = 3,1417$$

$$\text{Volume citoplasmático} = \% \text{ citoplasma} \times \text{volume nuclear} / \% \text{ núcleo}$$

$$\text{Volume celular} = \text{volume nuclear} + \text{volume citoplasmático}$$

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

$$\text{NC} = (\text{V}/\text{Vn})/\text{PT}$$

onde: NC = número total de células

V = volume líquido ocupado pelo tipo celular no parênquima testicular ( $\mu\text{L}$ )

Vn = volume celular da célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )

PT = média do peso líquido do testículo (g)

#### **4.4.8. Produção espermática diária por testículo e por grama de testículo**

Esta estimativa foi feita de acordo com França (1992), utilizando-se a seguinte fórmula:

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

onde: PED = produção espermática diária;

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

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

Para o cálculo da produção espermática diária foi utilizada a duração do CES para a linhagem BALB/c selvagem (8,8 dias) já determinada no Laboratório de Biologia Celular ICB/UFMG (Avelar et al., 2004) e que se encontra dentro do intervalo esperado para camundongos (Oakberg, 1956; Clermont & Trott, 1969). Deste modo, a duração do estágio VII (dias) de cada animal investigado foi obtida a partir da multiplicação da frequência deste estágio pela duração de um ciclo espermato gênico.

#### **4.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR**

Testículos de três camundongos de cada linhagem foram coletados para análise dos níveis relativos de mRNA para as proteínas referentes ao receptor de andrógeno, 3 beta-HSD e aromatase. A expressão de beta-actina foi obtida para normalização dos valores de expressão das proteínas de interesse. Os camundongos utilizados foram pesados e seus testículos congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C. O RNA total foi extraído das amostras usando o reagente Trizol. O tecido foi homogeneizado em um *ependorff* contendo 1mL de Trizol para cada 50 mg de tecido. Em seguida, adicionou-se 200µL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol., agitando-se vigorosamente por 15 segundos, levando-se a incubação por 3 minutos à temperatura ambiente. O homogenato foi centrifugado a 12000g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante incolor foi removido cuidadosamente e transferido para outro tubo no qual se adicionou 500µL de isopropanol, invertendo-se posteriormente o tubo por 3 vezes. Após esta etapa, aguardou-se 15 minutos para ocorrer a precipitação do RNA, antes de se submeter novamente o material à centrifugação a 12000g durante 15 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante, o *pellet* de RNA foi lavado por duas vezes com 1mL de etanol 75% gelado, sendo homogeneizado em vórtex e centrifugado

a 7500g durante 3 minutos a 4°C em cada lavagem. Após o RNA secar por 2 horas, este foi ressuspenso em 5µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), homogeneizando-se com a pipeta. A concentração do mesmo foi determinada por espectrofotometria no aparelho Nanodrop.

O RNA obtido foi então submetido à transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase. Inicialmente a amostra de RNA foi tratada com DNase utilizando-se 5µL de 10x DNase tampão, 1µL de DNase, 10µg de RNA e água DEPC para completar 50µL. Em seguida, os *ependorfs* foram incubados em banho-maria à 37°C por 30 minutos. A fim de parar a reação, acrescentou-se 5µL de DNase solução de parada (inibidor da reação). Após esse passo, os *ependorfs* foram homogeneizados em vórtex à temperatura ambiente por 2 minutos, centrifugados a 10000g por 90 segundos e o sobrenadante transferido para 5 recipientes com um volume de 10µL cada. Na etapa de síntese de cDNA, cada amostra de RNA tratada com DNase foi pipetada num volume de 10µL, e a este foram adicionados também tampão da transcriptase reversa M-MuLV (1µL), dNTP (0,8µL), inibidor de RNase Ribolock (1µL), *buffer* 10x (2µL), OligodT (1µL) e água (q.s.p. 20µL). Os *ependorfs* foram, em seguida, levados ao termociclador no seguinte programa: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e o cDNA assim obtido.

Os *primers* escolhidos para o presente estudo (Tabela 1) foram obtidos a partir de sequências já validadas (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>) e sintetizadas pela *Integrated DNA Technologies* (IDT).

**Tabela 1:** *Primers* usados para estudos de expressão gênica.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
Receptor de andrógeno <i>forward</i>	5'- CTGGGAAGGGTCTACCCAC - 3'
Receptor de andrógeno <i>reverse</i>	5'- GGTGCTATGTTAGCGGCCTC - 3'
Aromatase <i>forward</i>	5'- ATGTTCTTGGAATGCTGAACCC - 3'
Aromatase <i>reverse</i>	5'- AGGACCTGGTATTGAAGACGAG - 3'
3 beta-HSD <i>forward</i>	5' - TGGACAAAGTATTCGACCAGA - 3'
3 beta-HSD <i>reverse</i>	5'- GGCACACTTGCTTGAACACAG - 3'
Beta-actina <i>forward</i>	5'- GGCTGTATTCCTCCATCG - 3'
Beta-actina <i>reverse</i>	5'- CCAGTTGGTAACAATGCCATGT - 3'

Com a finalidade de se padronizar os *primers*, foram testadas três concentrações (200nM, 400nM e 800nM) no programa de qPCR StepOnePlus, Real-Time PCR System (Life) de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 2.

Após a padronização dos *primers* e, a partir do cDNA gerado, o ensaio de qPCR foi realizado. Para cada amostra de cDNA pipetou-se 2µL da mesma, 15µL de SYBR Green PCR Master Mix (Thermo), 3µL (para a concentração de 800nM), 1,5µL (para a concentração de 400nM) ou 0,75µL (para a concentração de 200nM) do *primer forward* e do *primer reverse*, e água (q.s.p. 30µL). Após homogeneizar, dividiu-se o volume final de 30µL a uma duplicata. Em seguida, configurou-se o StepOnePlus Real-Time PCR System (Life) usando o programa da Tabela 2. Cada placa foi repetida com os mesmos parâmetros.

**Tabela 2:** Detalhamento do programa de qPCR usado para quantificação da expressão gênica.

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

#### 4.6. IMUNOHISTOQUÍMICA

Fragmentos dos testículos de 4 animais destinados a imunohistoquímica foram fixados por perfusão vascular em solução de Bouin. Este material foi desidratado, incluído em paraplast, e secções histológicas com 4µm de espessura foram obtidas. Estas secções foram aderidas em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma), desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol e água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se tampão citrato (pH 6,0) em microondas, com potência máxima, por cinco minutos contados a partir da ebulição. Após o resfriamento, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da incubação dos cortes com peróxido de hidrogênio a 3%, por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com soro normal por 30 minutos e depois com o anticorpo primário “*overnight*” à 4°C. Foram utilizados anticorpos para a identificação dos receptores de LH e andrógeno, e das enzimas esteroidogênicas aromatase e 3beta-HSD.

Foram também testados anticorpos anti-Foxn1 e anti-DNA-PKc. Todos estes anticorpos foram testados quanto a titulação ideal. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão e incubadas com o anticorpo secundário biotilado por 60 minutos, seguido da incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase (Peroxidase Dual Link System-Dako Envision), por 30 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e os cortes contra-corados com Hematoxilina de Mayer. Após esta etapa, as lâminas foram analisadas para se investigar os tipos celulares marcados, bem como a localização dos mesmos no parênquima testicular. Para todas as reações foram realizados controles negativos, nos quais o anticorpo primário foi substituído pela solução contendo soro normal e que foi utilizada para realizar as diluições.

### 4.6.1. Quantificação da expressão imunohistoquímica

A fim de se quantificar a expressão do receptor de andrógeno, aromatase e 3beta-HSD nas células de Leydig, foram capturadas 6 imagens aleatórias do parênquima testicular de cada animal (4 animais no total). Sendo obtidas assim 24 fotos por grupo e aproximadamente 60 células por animal. Cada uma dessas imagens foi tratada no programa Photoshop CS3 v10.0 sendo convertidas em escala de cinza, e em seguida, as cores foram invertidas. Após esse passo, as mesmas foram analisadas no programa Image J. As células marcadas foram circuladas (o núcleo inteiro em marcações nucleares ou uma região de citoplasma para marcações citoplasmáticas) e os valores obtidos no histograma (que correspondem à intensidade de pixels) foram coletados, sendo as médias para cada animal obtidas a partir das 6 fotos tiradas. Para se excluir a variação de *background* que possivelmente fosse encontrada, circulou-se uma região sem células (lúmen de túbulo seminífero ou de vaso sanguíneo, por exemplo) e o valor obtido no histograma foi subtraído dos valores de cada célula avaliada.

## 4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram testados quanto à normalidade e homocedacidade e submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Correlação de Pearson foi utilizada para se avaliar a relação entre duas variáveis. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc). Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) e o nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. PESO CORPORAL, TESTICULAR E ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO

A média dos pesos corporal e testicular bem como o índice gonadossomático (IGS; massa testicular total/massa corporal x 100) obtidos para as três linhagens investigadas estão apresentados na Tabela 3. Conforme pode ser observado, não houve diferença no peso corporal entre os grupos investigados. Entretanto, o peso testicular de *nude* foi cerca de 20 % menor ( $p < 0,05$ ) em relação ao BALB/c selvagem. O menor IGS ( $p < 0,05$ ) entre as linhagens estudadas foi observado em *nude*.

**Tabela 3:** Dados biométricos de camundongos machos BALB/c selvagem, *nude* e *scid* (média  $\pm$  EPM).

	<b>selvagem</b>	<b><i>nude</i></b>	<b><i>scid</i></b>
Peso corporal (g)	26 $\pm$ 0,5 <sup>a*</sup>	28 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 1 <sup>a</sup>
Peso testicular (mg)	102 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	83 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>	89 $\pm$ 6,4 <sup>ab</sup>
IGS	0,8 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,7 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha denotam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.2. MORFOMETRIA DO TESTÍCULO

As análises morfométricas do testículo nas três linhagens investigadas estão representadas na Tabela 4. O percentual de túbulos seminíferos variou de maneira significativa entre os grupos e apresentou correlação positiva e significativa com o percentual de epitélio seminífero em *nude* ( $r = 0,82$ ) e *scid* ( $r = 0,87$ ). O lume (%) e a túnica própria (%) foram diferentes entre os grupos ( $p < 0,05$ ) e apresentaram uma relação inversa, onde a ocorrência de maior percentual de lume determinava o menor valor de túnica própria. Particularmente em *nude*, a correlação lume/túnica própria foi alta ( $r = -0,84$ ) e significativa ( $p < 0,05$ ). Os percentuais de espaço intertubular e células de Leydig foram diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, sendo os maiores valores encontrados nas linhagens imunodeficientes. Assim, uma correlação positiva e significativa foi encontrada entre o compartimento intertubular e porcentagem de células de Leydig para *nude* ( $r = 0,82$ ) e *scid* ( $r = 0,91$ ). O diâmetro tubular assim como a altura do epitélio e o lume tubular foram maiores ( $p < 0,05$ ) em *nude* em comparação com *scid* e selvagem. Por outro lado, o comprimento total de túbulo seminífero obtido por testículo e por

grama de testículo foi significativamente menor em *nude* em relação às demais linhagens.

Os volumes ocupados pelos diferentes componentes do parênquima testicular estão listados na tabela 4. O volume do testículo foi significativamente menor em *nude* (~80  $\mu\text{L}$ ) em comparação às linhagens selvagem (~99  $\mu\text{L}$ ) e *scid* (~86  $\mu\text{L}$ ). Por outro lado, o volume ocupado pelos túbulos seminíferos foi maior ( $p < 0,05$ ) na linhagem selvagem (~91  $\mu\text{L}$ ). Nesta mesma tabela observa-se que o volume ocupado pelas células de Leydig foi de ~4, ~6 e ~7  $\mu\text{L}$ , respectivamente em selvagem, *nude* e *scid*, sendo estes valores significativamente diferentes. Correlação positiva e significativa foi encontrada entre o volume ocupado pelos túbulos seminíferos e o volume de epitélio seminífero nas três linhagens (selvagem,  $r = 0,90$ ; *nude*,  $r = 0,99$ ; *scid*,  $r = 0,99$ ), denotando que este é o componente que mais influencia na variação do volume dos túbulos seminíferos (entre 81 e 99%). Também positiva e significativa foi a correlação entre o volume de túbulos seminíferos e o comprimento tubular total em selvagem ( $r = 0,97$ ), *nude* ( $r = 0,95$ ) e *scid* ( $r = 0,95$ ). O volume do lume tubular apresentou correlação positiva com a população de célula de Sertoli por testículo nas linhagens selvagem e *scid*, sendo respectivamente,  $r = 0,75$  e  $r = 0,74$  ( $p < 0,05$ ). Nas linhagens imunodeficientes o volume do espaço intertubular correlacionou-se positivamente com o volume de célula de Leydig (*nude*,  $r = 0,92$ ; *scid*,  $r = 0,69$ ;  $p < 0,05$ ).



**Tabela 4:** Histometria dos testículos de camundongos BALB/c selvagens, *nude* e *scid* (média ± EPM).

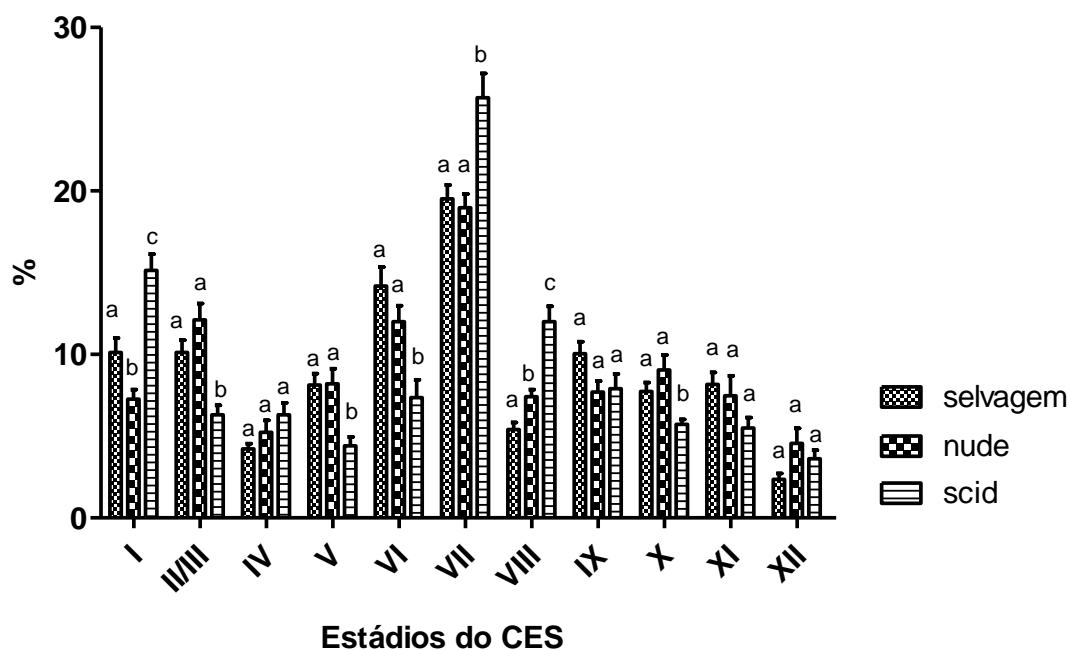
	Selvagem	<i>nude</i>	<i>scid</i>
Volume líquido do testículo <sup>1</sup>	99 ± 2 <sup>a*</sup>	80 ± 5 <sup>b</sup>	86 ± 7 <sup>a</sup>
Proporção volumétrica (%) / Volume (µL)	92 ± 0,004 <sup>a</sup> / 91 ± 2 <sup>a</sup>	90 ± 0,01 <sup>b</sup> / 72 ± 5 <sup>b</sup>	88 ± 0,01 <sup>c</sup> / 76 ± 6 <sup>b</sup>
Espaço tubular			
Epitélio seminífero	80 ± 0,01 <sup>a</sup> / 79 ± 2 <sup>a</sup>	78 ± 0,005 <sup>a</sup> / 62 ± 4 <sup>b</sup>	78 ± 0,01 <sup>a</sup> / 68 ± 6 <sup>a,b</sup>
Lume	9,4 ± 0,01 <sup>a</sup> / 9 ± 0,7 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,005 <sup>b</sup> / 6 ± 0,6 <sup>b</sup>	4,1 ± 0,001 <sup>c</sup> / 4 ± 0,3 <sup>c</sup>
Túnica própria	3 ± 0,001 <sup>a</sup> / 3 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,002 <sup>b</sup> / 3 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,004 <sup>c</sup> / 5 ± 0,6 <sup>b</sup>
Espaço intertubular	8 ± 0,004 <sup>a</sup> / 8 ± 0,4 <sup>a</sup>	10 ± 0,01 <sup>b</sup> / 8 ± 0,5 <sup>a</sup>	12 ± 0,01 <sup>c</sup> / 10 ± 0,5 <sup>b</sup>
Células de Leydig	4 ± 0,004 <sup>a</sup> / 4 ± 0,4 <sup>a</sup>	7 ± 0,006 <sup>b</sup> / 6 ± 0,6 <sup>b</sup>	9 ± 0,01 <sup>c</sup> / 7 ± 0,3 <sup>c</sup>
Vaso sanguíneo	2,6 ± 0,003 <sup>a</sup> / 3 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,004 <sup>a</sup> / 2 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,002 <sup>b</sup> / 1,2 ± 0,2 <sup>b</sup>
Vaso linfático	0,93 ± 0,001 <sup>a</sup> / 1 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,0004 <sup>b</sup> / 0,1 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,001 <sup>c</sup> / 0,4 ± 0,1 <sup>c</sup>
Outros	0,5 ± 0,0003 <sup>a</sup> / 0,5 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,001 <sup>a</sup> / 0,2 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,002 <sup>b</sup> / 1,3 ± 0,2 <sup>b</sup>
Diâmetro Tubular (µm)	224 ± 2 <sup>a</sup>	243 ± 3 <sup>b</sup>	212 ± 3 <sup>c</sup>
Comprimento tubular total			
Grama de testículo (m/g)	23 ± 0,4 <sup>a</sup>	19 ± 0,4 <sup>b</sup>	25 ± 0,6 <sup>a</sup>
Testículo (m)	2,3 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,09 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,15 <sup>c</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha denotam diferenças estatisticamente diferentes (p<0,05).

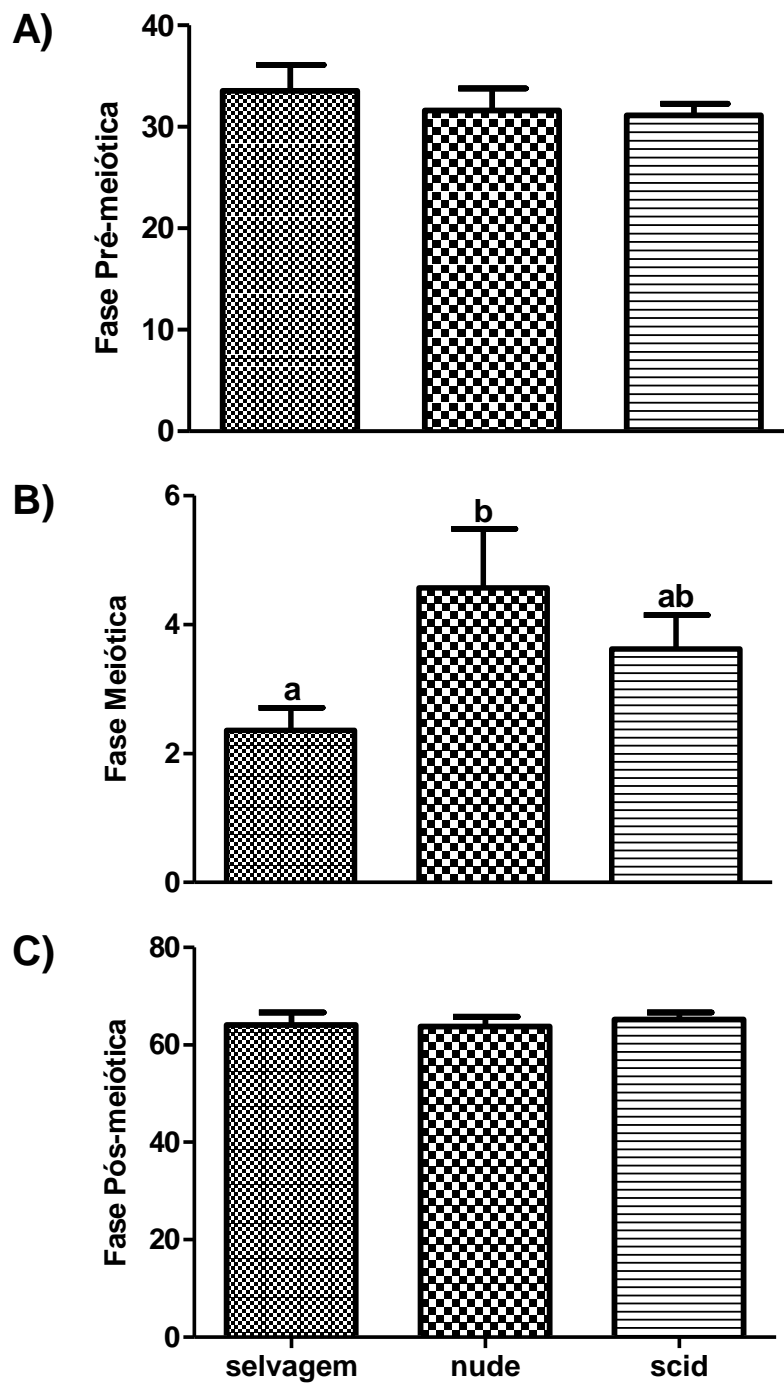
<sup>1</sup>Corresponde ao peso bruto do testículo menos o peso da túnica albugínea.

### 5.3. FREQUÊNCIA DE ESTÁDIOS

A Figura 3 mostra as frequências relativas dos estádios nas três linhagens de camundongos investigadas. Assim, entre os grupos foram observadas diferenças significativas na frequência dos estádios I, II/III, V, VI, VII, VIII, X e XII. O estágio VII, no qual ocorre a espermiacção, foi o mais frequente (~19% - 26%) em todas as linhagens investigadas. Particularmente nos estádios I e VIII a variação existente entre a maior e menor frequência foi maior que 108%. A Figura 4 apresenta a frequência combinada dos estádios em camundongos, tomando como referência a ocorrência da meiose. A fase pré-meiótica, que corresponde aos estádios VIII - XI em camundongos ficou em torno de 32%, não variando significativamente entre as linhagens investigadas; entretanto, a fase das divisões meióticas (estádio XII) em *nude* foi mais frequente que na linhagem selvagem (4,6% e 2,4%, respectivamente). Embora as frequências tenham se concentrado na fase pós-meiótica (~64%), nenhuma diferença estatística foi verificada entre os grupos investigados.



**Figura 3:** Frequência de estádios do CES classificados de acordo com o método do sistema acrossômico em camundongos da linhagem BALB/c selvagem, *nude* e *scid*. Diferenças significativas foram encontradas para os estádios I, II/III, V, VI, VII, VIII, X e XII. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4:** Frequências dos estádios do CES agrupados em fases pré-meiótica (A), meiótica (B) e pós-meiótica (C) em camundongos BALB/c selvagem, *nude* e *scid*. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

## 5.4. CONTAGENS CELULARES E QUANTIFICAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE

### 5.4.1. Populações e Razões celulares

A Tabela 6 apresenta os valores médios obtidos para os números corrigidos de células espermatogênicas e de nucléolo de célula de Sertoli avaliados no estágio VII nas três linhagens de camundongos investigadas. A avaliação dos números de espermatócitos primários em paquíteno e espermátides arredondadas demonstrou um valor semelhante entre os grupos. Nas linhagens imunodeficientes observou-se que o número de nucléolos de células de Sertoli foi semelhante, porém significativamente maior que aquele encontrado em selvagem.

**Tabela 5:** Números corrigidos de células germinativas e nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulos seminíferos no estágio VII do CES de camundongos BALB/c selvagens, *nude* e *scid* (média  $\pm$  EPM).

	<b>selvagem</b>	<b><i>nude</i></b>	<b><i>scid</i></b>
Nucléolo CS	6 $\pm$ 0,2 <sup>a*</sup>	7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	8 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
Espermatócito primário em paquíteno	27 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	28 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	30 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>
Espermátide arredondada	63 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	69 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	62 $\pm$ 2 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha denotam diferenças estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

As razões celulares obtidas a partir das contagens realizadas no estágio VII do CES estão apresentadas na Tabela 7. Conforme pode ser observado, aproximadamente 8 espermátides arredondadas foram encontradas por célula de Sertoli na linhagem *scid*, correspondendo à menor eficiência da célula de Sertoli ( $p < 0,05$ ) entre os três grupos estudados. O índice meiótico (razão entre o número de espermátides arredondadas e espermatócitos primários em paquíteno) apresentou variação máxima de ~16% entre as linhagens, sendo respectivamente para *scid*, selvagem e *nude*: 2,1; 2,3 e 2,5 ( $p < 0,05$ ). Estes valores indicam o número real de espermátides arredondadas formadas a partir de

um espermátocito primário, revelando as perdas durante as divisões meióticas (~38 - 48%).

**Tabela 6:** Razões entre números celulares corrigidos, obtidos no estágio VII do CES em camundongos BALB/c selvagens, *nude* e *scid* (média± EPM).

	selvagem	<i>nude</i>	<i>scid</i>
Espermátide Ar : Célula de Sertoli	10,5 ± 0,2 <sup>a*</sup>	9,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,9 ± 0,5 <sup>b</sup>
Espermátide Ar :Espermátocito I P	2,3 ± 0,004 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,04 <sup>b</sup>

Espermátocitos primários em paquíteno (P); Espermátides arredondadas (Ar).

\*Letras diferentes na mesma linha denotam diferenças estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.2. Número de Células de Sertoli e Produção Espermática Diária

Os cálculos dos números médios de célula de Sertoli por testículo e por grama de parênquima testicular foram estimados a partir do conhecimento do número corrigido de células de Sertoli encontrado por secção transversal do túbulo no estágio VII e do comprimento total de túbulos seminíferos. Este cálculo parte do pressuposto que a população deste tipo celular é estável ao longo dos diferentes estádios do CES (França, 1991). Assim, na Tabela 8 observa-se que os números de célula de Sertoli por testículo e por grama de testículo ficaram igualmente distribuídos entre dois patamares diferentes ( $p < 0,05$ ); um inferior, no qual estavam incluídas as linhagens *nude* ( $2,8 \times 10^6$ ;  $34,6 \times 10^6$ , respectivamente) e selvagem ( $3,5 \times 10^6$ ;  $35 \times 10^6$ , respectivamente) e outro superior, representado pela linhagem *scid* ( $4,3 \times 10^6$ ;  $50,7 \times 10^6$ , respectivamente).

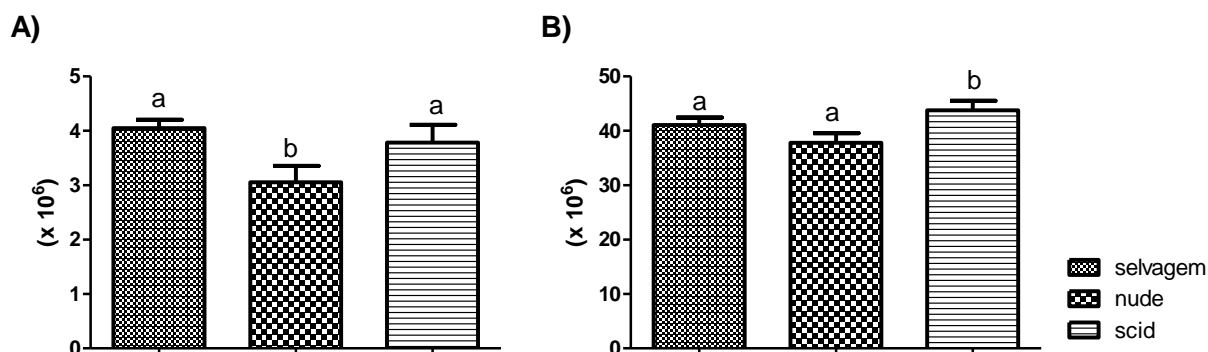
**Tabela 7:** Números de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo em camundongos BALB/c selvagens, *nude* e *scid* (média ± EPM).

	selvagem	<i>nude</i>	<i>scid</i>
Células de Sertoli/testículo ( $10^6$ )	3,5 ± 0,1 <sup>a*</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,3 <sup>b</sup>
Células de Sertoli/g de testículo ( $10^6$ )	35 ± 1 <sup>a</sup>	35 ± 2 <sup>a</sup>	51 ± 3 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha denotam diferenças estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Conforme apresentado na Figura 5, a produção espermática diária por testículo variou ~30% entre o menor (*nude*;  $3,06 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ) e o maior (selvagem;  $4,05 \times 10^6$ ) valor obtido para os grupos investigados. A amplitude de variação encontrada para a produção espermática diária por grama de testículo (eficiência espermatogênica) correspondeu a ~15% entre *nude* ( $37,8 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ) e *scid* ( $43,8 \times 10^6$ ). A produção

espermática diária por testículo apresentou correlação positiva e significativa com o número de células de Sertoli por testículo em selvagem, *nude* e *scid* ( $r = 0,84$ ;  $r = 0,86$ ;  $r = 0,73$ ; respectivamente). O parâmetro volume de epitélio seminífero demonstrou uma interação positiva e significativa com a produção espermática diária por testículo, especificamente nos grupos de camundongos imunodeficientes (*nude*,  $r = 0,94$ ; *scid*,  $r = 0,91$ ).



**Figura 5:** Produção espermática diária por testículo (A) e por grama de testículo (B) em camundongos BALB/c selvagem, *nude* e *scid*. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.5 MORFOMETRIA DAS CÉLULAS DE LEYDIG

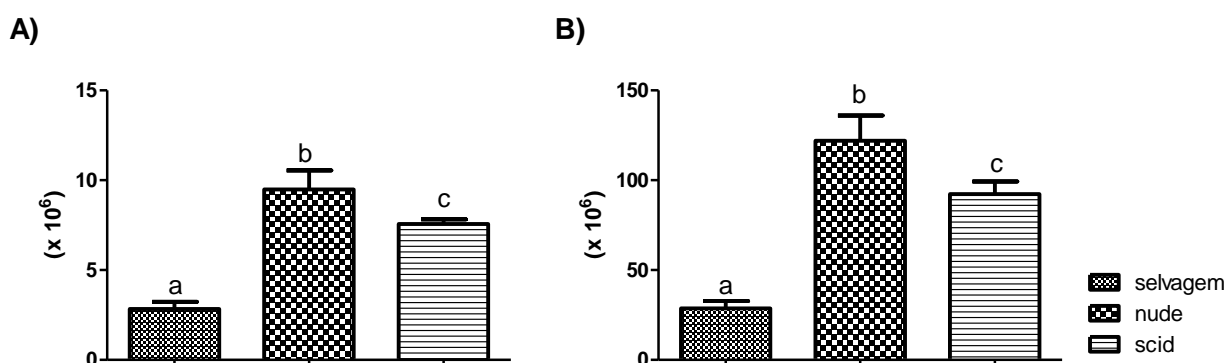
Diferenças marcantes foram encontradas para o tamanho da célula de Leydig entre as linhagens investigadas (Tabela 9). Assim, o volume individual da célula de Leydig em *nude* ( $\sim 619 \mu\text{m}^3$ ) correspondeu a 43% do volume obtido em BALB/c selvagem ( $\sim 1444 \mu\text{m}^3$ ) ( $p < 0,05$ ). Para todos os parâmetros investigados, os valores observados na linhagem imunodeficiente *scid* ficaram num patamar intermediário entre os valores obtidos para *nude* e selvagem.

**Tabela 8:** Parâmetros de células de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ) em camundongos selvagens, *nude* e *scid* da linhagem BALB/c.

	selvagem	<i>nude</i>	<i>scid</i>
Volume nuclear	$228 \pm 5^{a*}$	$155 \pm 8^b$	$207 \pm 10^a$
Volume citoplasmático	$1216 \pm 95^a$	$465 \pm 57^b$	$760 \pm 35^c$
Volume individual	$1444 \pm 99^a$	$619 \pm 63^b$	$967 \pm 43^c$

\* Letras diferentes na mesma linha denotam diferenças estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Os números de células de Leydig por testículo e por grama de testículo foram diferentes ( $p < 0,05$ ) entre as linhagens investigadas, conforme demonstrado na Figura 6. Contudo, observou-se que estes parâmetros estavam marcadamente aumentados no grupo *nude* em comparação ao grupo selvagem. Assim, os números de células de Leydig por testículo e por grama de testículo obtidos para *nude* corresponderam respectivamente a 3,4 e 4 vezes aqueles encontrados para a linhagem selvagem. Especificamente em *nude*, o número de células de Leydig por grama de testículo apresentou correlação negativa com o volume celular individual ( $r = - 0,69$ ;  $p < 0,05$ ) e produção espermática diária por grama de testículo ( $r = - 0,82$ ;  $p < 0,05$ ). Nos camundongos da linhagem *scid*, o número de célula de Leydig por grama de testículo correlacionou-se positivamente com o percentual de compartimento intertubular ( $r = 0,86$ ,  $p < 0,05$ ) e negativamente com o peso testicular ( $r = - 0,91$ ;  $p < 0,05$ ) e produção espermática diária por testículo ( $r = - 0,96$ ;  $p < 0,05$ ). Para os animais de fenótipo selvagem, os números de células de Leydig por testículo e por grama de testículo demonstraram correlação negativa com o volume nuclear ( $r = -0,73$ ;  $r = - 0,71$ ;  $p < 0,05$ ).

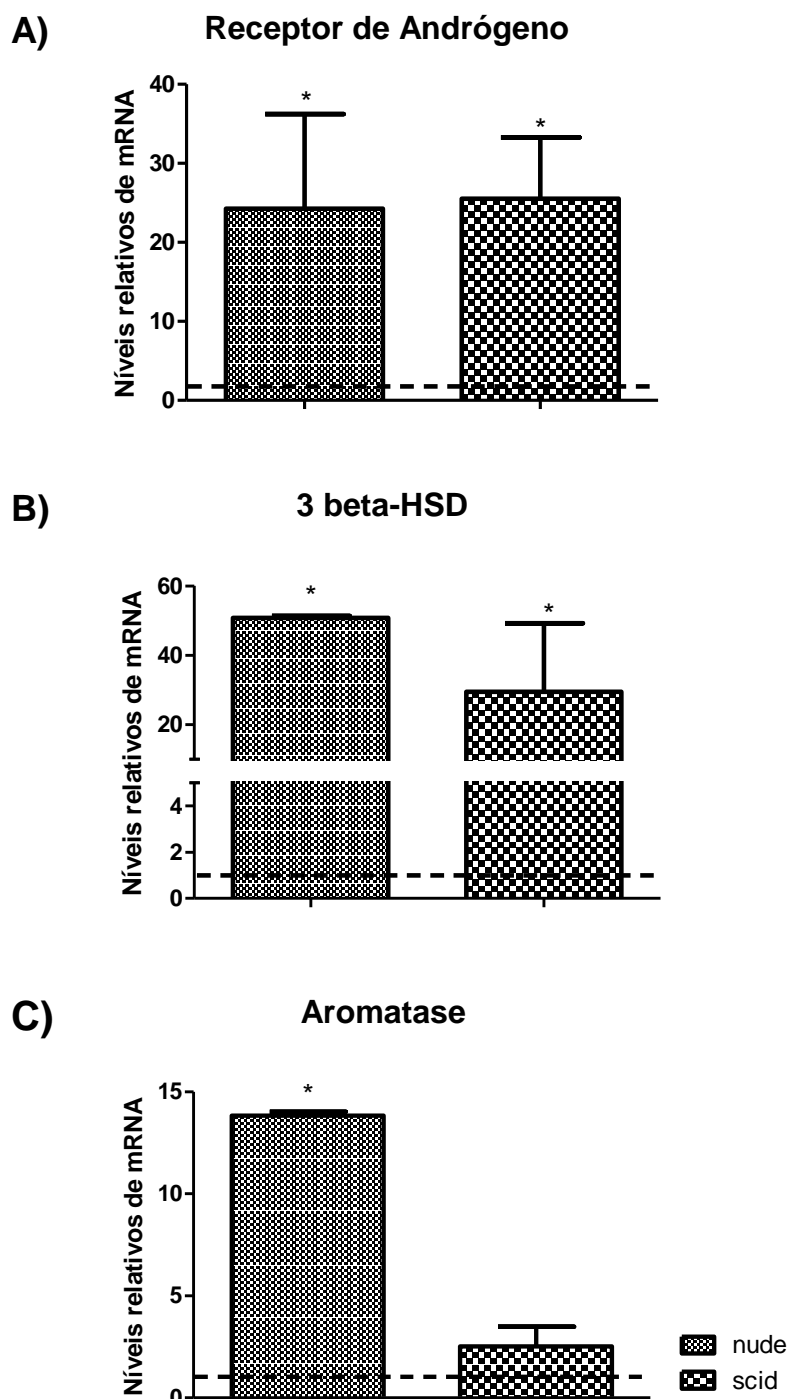


**Figura 6:** Número de células de Leydig por testículo (A) e por grama de testículo (B) em camundongos BALB/c selvagem, *nude* e *scid*. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR

A expressão relativa do mRNA do receptor de andrógeno, aromatase e 3beta-HSD foi avaliada pelo método de PCR em tempo real (qPCR) (Figura 7). Assim, em ambas as linhagens imunodeficientes os níveis relativos de mRNA do receptor de andrógeno estavam ~25 vezes mais elevados ( $p < 0,05$ ) em comparação com o selvagem (Figura 5A). O conteúdo de mRNA da enzima esteroidogênica 3beta-HSD (Figura 7B) foi cerca de 25 vezes maior em *scid* e ~50 vezes maior em *nude* comparando-se com a linhagem

selvagem ( $p < 0,05$ ). Um aumento de aproximadamente 5 e 15 vezes na quantidade relativa de mRNA para aromatase ( $p < 0,05$ ) foi observado na linhagem *nude* em comparação com o fenótipo *scid* e selvagem, respectivamente (Figura 7C). Por outro lado, o conteúdo de mRNA da aromatase foi semelhante entre *scid* e selvagem.

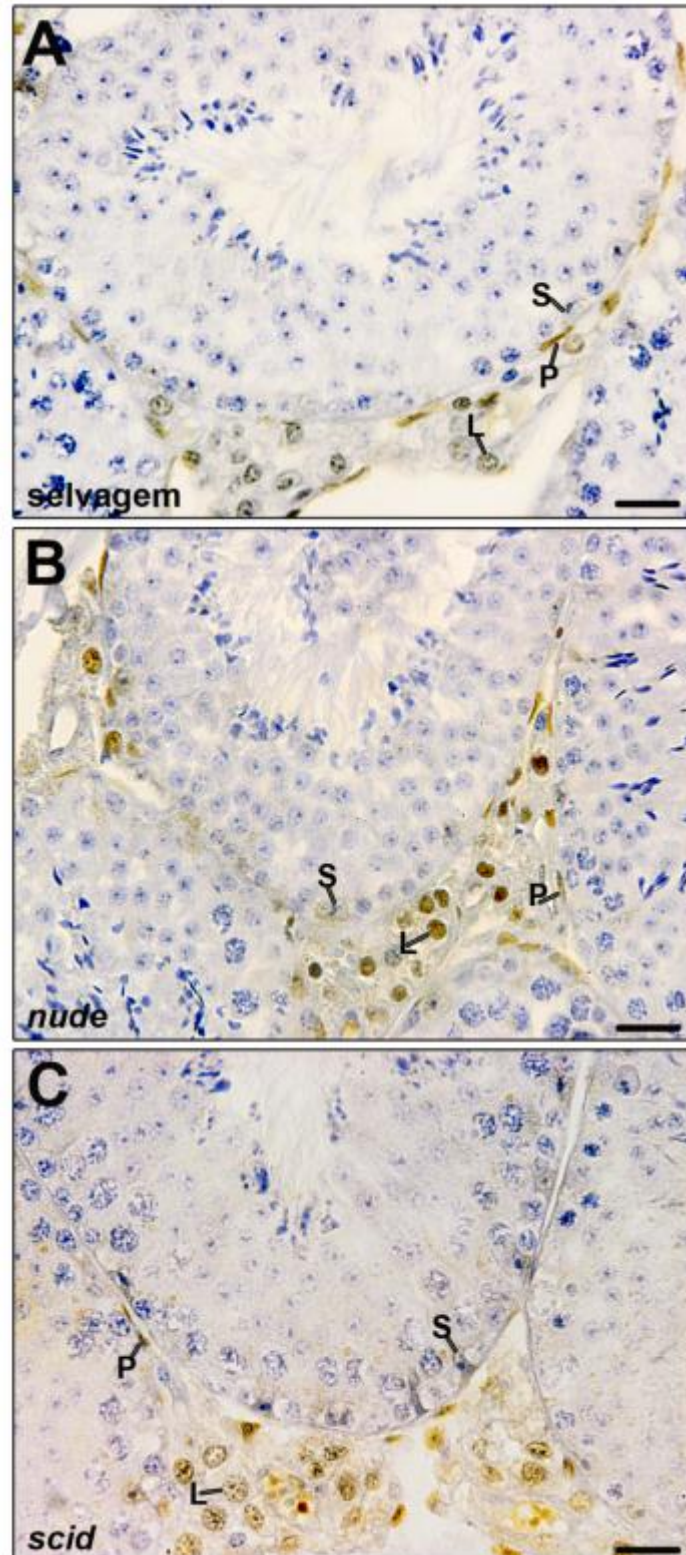


**Figura 7:** Quantificação da expressão do mRNA do receptor de andrógenos (A) e das enzimas 3beta HSD (B) e aromatase (C) nos testículos de camundongos BALB/c *nude* e *scid* em relação ao selvagem. A linha tracejada representa o valor de 1 determinado para o BALB/c selvagem e as colunas referem-se à quantidade relativa de mRNA em comparação ao selvagem. (\*) representa diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao selvagem. Não foram encontradas diferenças significativas entre *nude* e *scid* para receptor de andrógenos e 3beta-HSD, apenas para aromatase.

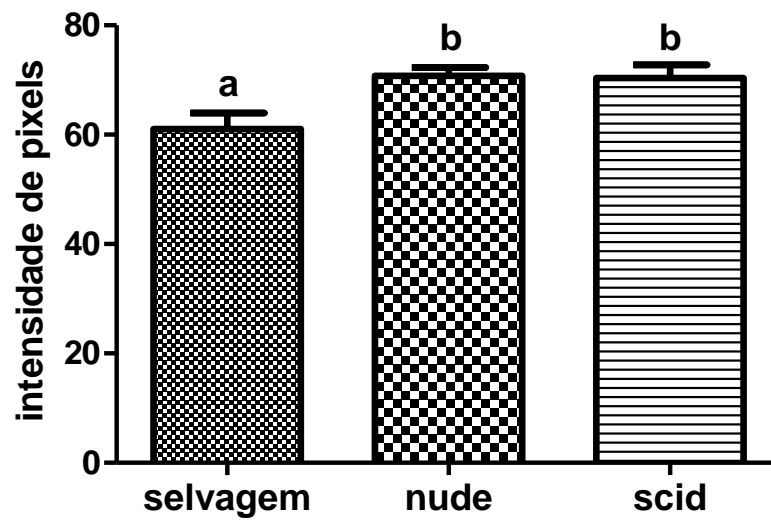


### **5.7. IMUNOHISTOQUÍMICA**

A fim de se investigar a função das células testiculares nas três linhagens estudadas, foram realizadas reações imunohistoquímicas para o receptor de andrógeno, receptor de hormônio luteinizante, as enzimas esteroidogênicas 3beta-HSD e aromatase, e para os produtos específicos dos genes *Foxn1* e *Prkdc*. Assim, a marcação para o receptor de andrógeno foi encontrada limitada ao núcleo nas células peritubulares mióides, células endoteliais, células de Sertoli e células de Leydig nas três linhagens investigadas (Figura 8). Por meio da quantificação da intensidade de pixels (Figura 9) foi possível verificar que as células de Leydig das linhagens imunodeficientes (*nude* e *scid*) apresentaram marcação mais forte em comparação com selvagem ( $p < 0,05$ ). Particularmente em *nude*, a expressão do receptor de andrógeno mostrou uma correlação negativa, porém significativa, com a população de células de Leydig por testículo.

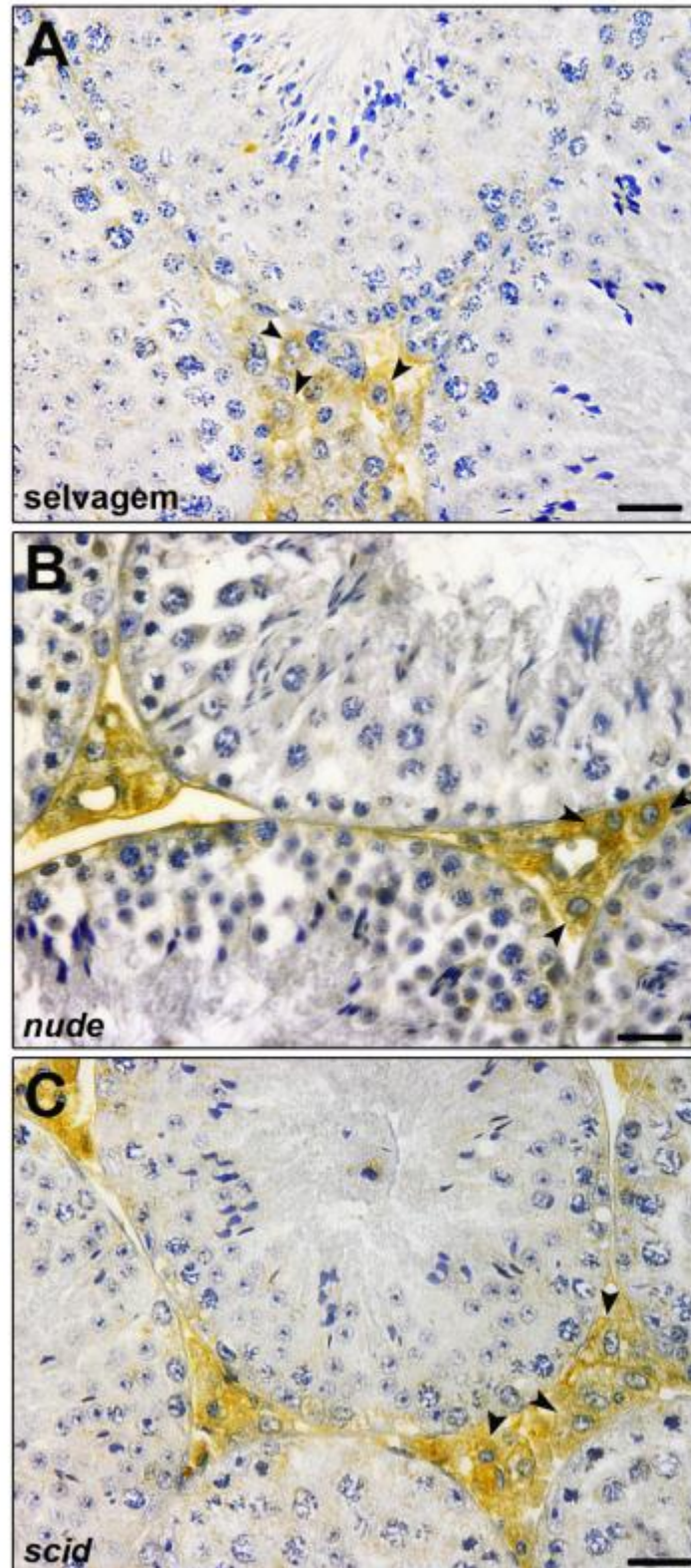


**Figura 8:** Imunohistoquímica para o receptor de andrógeno em testículos de camundongos BALB/c selvagem (A), *nude* (B) e *scid* (C). S, célula de Sertoli; P, célula peritubular mióide; L, célula de Leydig. Barra = 20  $\mu$ m.



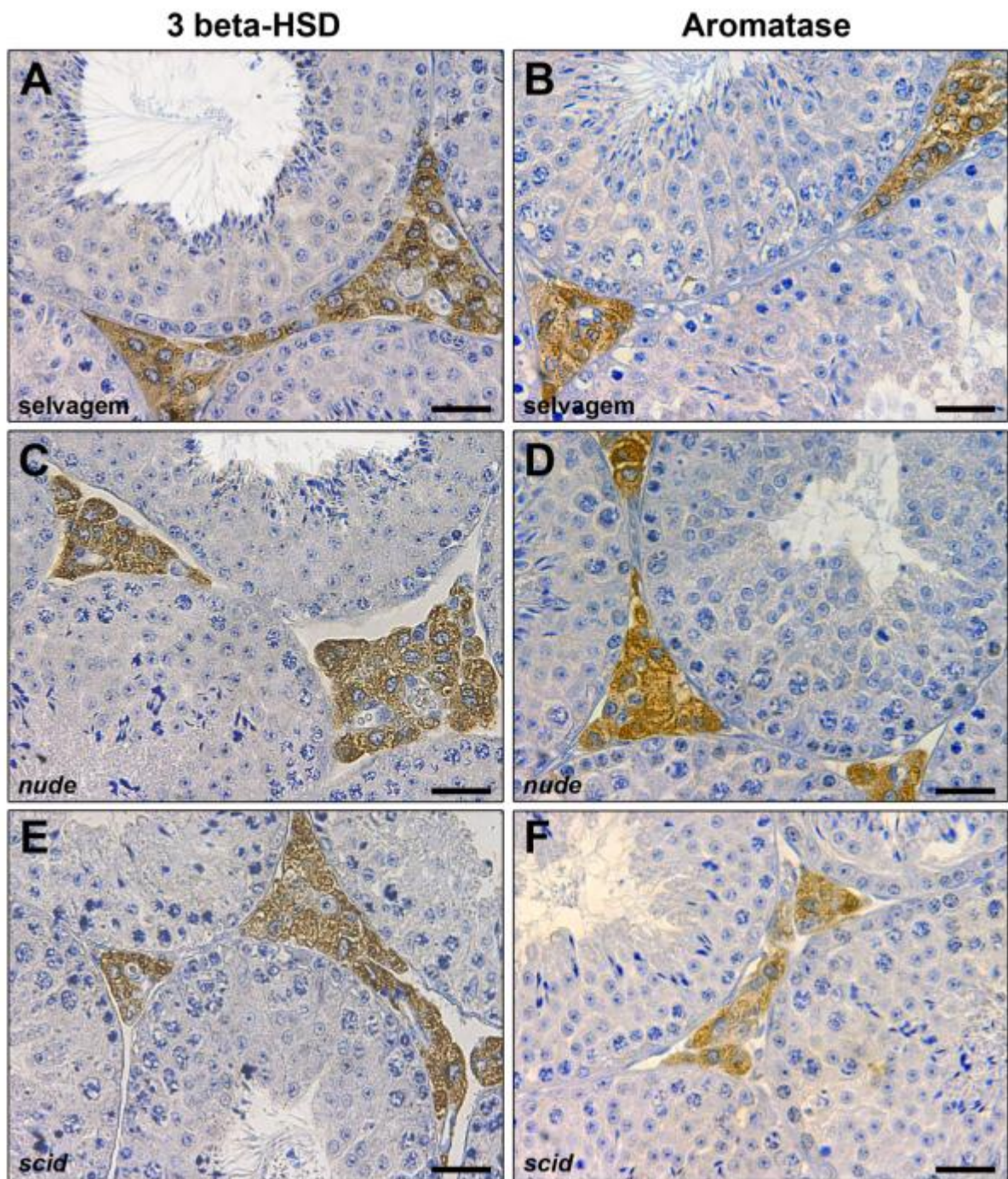
**Figura 9:** Quantificação da expressão do receptor de andrógenos nas células de Leydig de camundongos BALB/c selvagem, *nude* e *scid*. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

A imunomarcção para o receptor do hormônio luteinizante (rLH) mostrou a distribuição na membrana citoplasmática das células de Leydig nas três linhagens de camundongos investigadas (Figura 10).

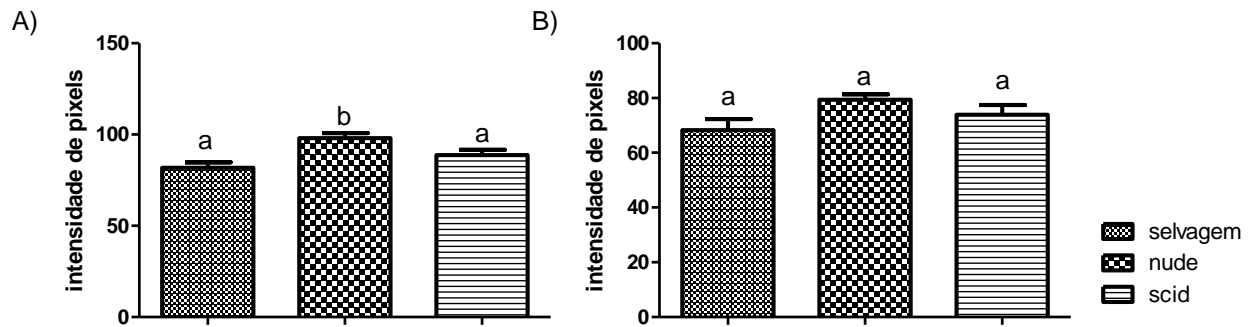


**Figura 10:** Imunohistoquímica para o receptor de hormônio luteinizante em testículos de camundongos BALB/c selvagem (A), *nude* (B) e *scid* (C). Nas três linhagens investigadas a cabeça de seta indica a marcação na membrana plasmática nas células de Leydig. Barra = 20  $\mu$ m.

Para as enzimas esteroidogênicas 3beta-HSD e aromatase foi observado um padrão de marcação citoplasmática das células de Leydig nos camundongos imunodeficientes e selvagem (Figura 11). Entretanto, a avaliação de pixels demonstrou que a intensidade de marcação para a 3beta-HSD foi maior ( $p < 0,05$ ) em *nude* (Figura 12 A) e que a aromatase encontrava-se igualmente distribuída entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ) (Figura 12 B). Contudo, correlação positiva e significativa foi observada entre aromatase e a população de células de Leydig apenas na linhagem imunodeficiente *scid*.

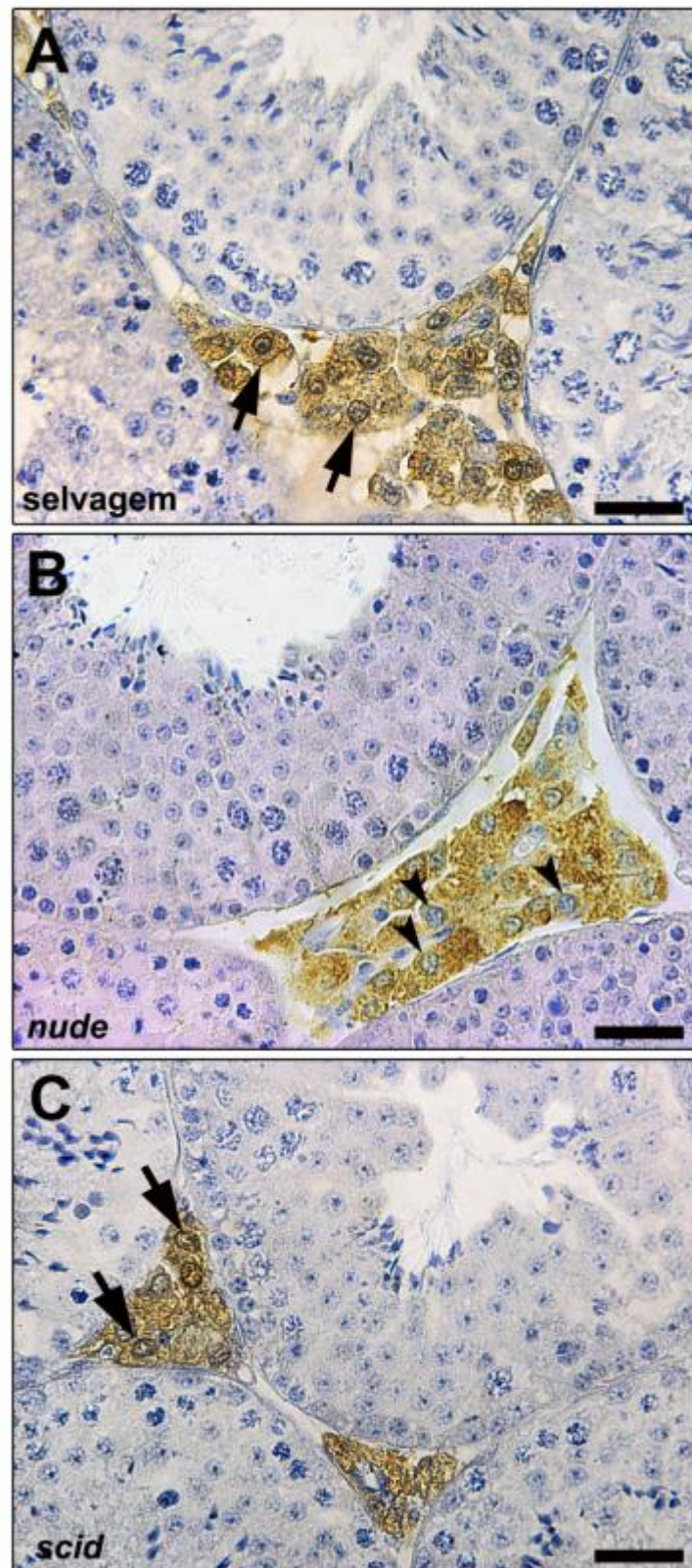


**Figura 11:** Imunohistoquímica para as enzimas esteroidogênicas 3beta-HSD e aromatase em testículos de camundongos BALB/c selvagem (A e B), *nude* (C e D) e *scid* (E e F). Observe forte marcação citoplasmática nas células de Leydig nas três linhagens investigadas. Barra = 35  $\mu$ m.



**Figura 12:** Quantificação por pixels da expressão das enzimas 3beta-HSD (A) e aromatase (B) nas células de Leydig de camundongos BALB/c selvagem, *nude* e *scid*. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

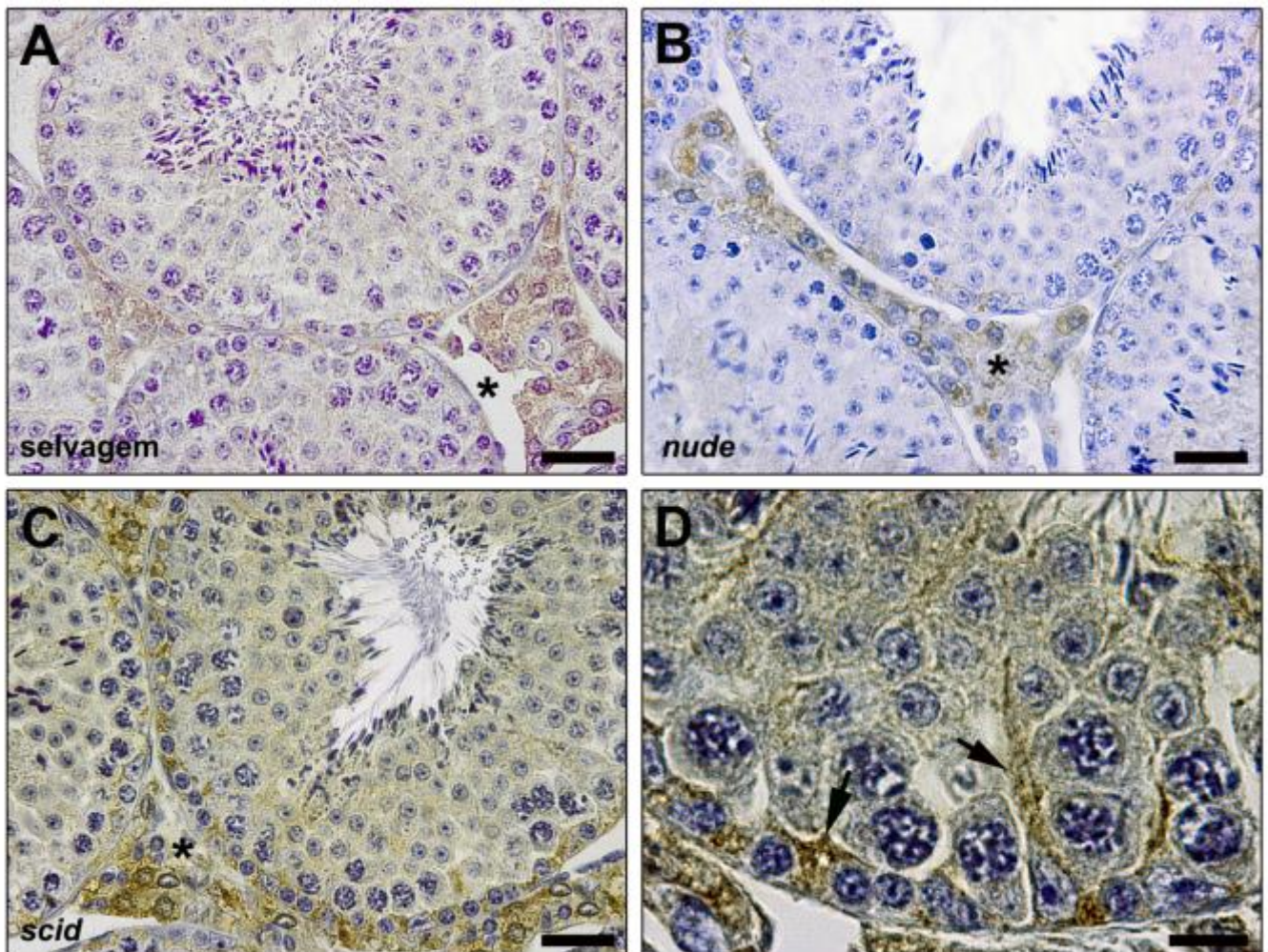
A imunohistoquímica realizada para a proteína Foxn1 mostrou a expressão deste gene nas células de Leydig (Figura 13) nas três linhagens investigadas. Assim, foi observada uma distribuição citoplasmática e nuclear em selvagem e *scid* (Figura 13 A e 13 C), entretanto a marcação de núcleo estava ausente em *nude* (Figura 13 B).



**Figura 13:** Distribuição do fator de transcrição Foxn1 em testículos de camundongos BALB/c selvagem (A), *nude* (B) e *scid* (C). Note em A e C, a expressão da proteína no citoplasma e núcleo das células de Leydig (seta). Por outro lado, a marcação nuclear estava ausente nas células de Leydig em B (cabeça de seta). Barra = 35  $\mu$ m



De modo semelhante, a reação de imunohistoquímica específica para a DNA-PKc revelou a distribuição citoplasmática desta enzima nas células de Leydig e de Sertoli em selvagem, *nude* e também em *scid* (Figura 14). Particularmente nas células de Sertoli, a imunomarcação evidenciou as porções do citoplasma desta célula somática dispostas entre as células germinativas nas diferentes fases da diferenciação celular (Figura 14 D).



**Figura 14:** Identificação da proteína DNA-PKc em testículos de camundongos BALB/c selvagem (A), *nude* (B) e *scid* (C). Note no compartimento intertubular (\*) padrão de marcação citoplasmática nas células de Leydig e nas células de Sertoli no túbulo seminífero. Observe em D a marcação positiva (seta) revelando as projeções da célula de Sertoli. Barra A - C = 35  $\mu$ m; Barra D = 14  $\mu$ m.

## 6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Embora os camundongos *nude* e *scid* sejam modelos experimentais importantes, surpreendentemente existem poucos trabalhos na literatura que abordam a estrutura e a função testiculares nessas linhagens. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de se investigar de maneira detalhada, os vários parâmetros morfofuncionais do testículo de camundongos mutantes para os genes *Foxn1* e *Prkdc*, de maneira comparada com animais de fenótipo selvagem.

A biometria testicular representa um parâmetro muito importante para a avaliação andrológica de mamíferos, pois, além de fornecer informações sobre a normalidade do órgão, permite estimar, por exemplo, a taxa de produção espermática (Amann, 1970; Amann & Schanbacher, 1983; França & Russell, 1998). Ainda, os testículos representam um determinado percentual do peso corporal, correspondendo esta relação ou investimento na reprodução ao índice gonadossomático (IGS) (Setchell & Breed, 2006). No presente estudo não foi observada variação no peso corporal entre os grupos, de modo que o menor IGS observado em *nude* correspondeu à interferência do menor peso testicular obtido para esta linhagem. Contudo, este valor ainda se encontrava dentro do intervalo esperado para camundongos (0,55 - 0,8; Clermont & Trott, 1969; Avelar et al., 2004).

A proporção entre os compartimentos tubular (espermatogênico) e intertubular (esteoidogênico) é bastante variável em mamíferos (França e Russell, 1998; Godinho, 1999; Neves, 2001; Almeida, 2002; Leal, 2004; Soares, 2009), sendo um dos principais fatores responsáveis pela variação da produção espermática entre as espécies. Em camundongos, os túbulos seminíferos correspondem a aproximadamente 92% do parênquima testicular (Clermont & Trott, 1969; Avelar et al., 2004). Entretanto, nas linhagens imunodeficientes investigadas, particularmente em *scid*, o percentual de túbulo seminífero obtido foi inferior àquele esperado para camundongos. Ao contrário, nestes mesmos grupos mutantes, o compartimento intertubular correspondeu a um percentual superior à média para camundongos, representada pela linhagem selvagem. Conforme será discutido mais detalhadamente adiante, o componente do espaço intertubular que mais contribuiu para este aumento e que sofreu marcantes variações entre as linhagens investigadas foi a célula de Leydig. Assim, o percentual ocupado pelas células esteroideogênicas assim como o volume total destas células nos testículos

das linhagens imunodeficientes foi cerca de 80-120% maior que a média para camundongos selvagens.

A literatura pertinente a camundongos de linhagens selvagens (O'Keane et al., 1986; Avelar et al., 2004) relata a existência de nítida tendência na qual indivíduos de menor peso corporal apresentam também menor diâmetro tubular médio. Assim, esta tendência, presente também em outras espécies de mamíferos (Okwun et al., 1996; Cordeiro Júnior, 2009; Soares, 2009), foi observada nas linhagens de camundongos portadoras de mutação investigadas no presente trabalho. Assim, *scid* e *nude*, corresponderam ao menor e maior diâmetro tubular, respectivamente. Ademais, a correlação encontrada entre o diâmetro tubular e peso corporal ( $r = 0,80$ ) na linhagem *scid* indica claramente esta relação.

O volume dos diversos componentes testiculares é diretamente influenciado pelo peso líquido do testículo, o que explica algumas dissonâncias entre os resultados de proporção volumétrica e volume dos diferentes componentes do testículo observadas no presente estudo. Além disso, foi possível verificar, a partir dos altos valores de correlações, que o parâmetro epitélio seminífero corresponde ao principal responsável pelas variações no volume de túbulos seminíferos.

O comprimento total de túbulos seminíferos é diretamente influenciado pelo volume de túbulos seminíferos, mantendo uma relação inversa com o diâmetro tubular (Attal & Courot, 1963). Assim, de acordo com os achados do presente estudo, os valores obtidos para este importante parâmetro testicular retrataram o volume de túbulo seminífero das mesmas, variando em função deste parâmetro e não das diferenças encontradas para o diâmetro tubular. Neste sentido, as linhagens mutantes, nas quais o volume de túbulo seminífero estava diminuído em relação ao selvagem, apresentaram, por conseguinte, o menor comprimento total de túbulos seminíferos por testículo.

A frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é classicamente considerada uma constante para uma determinada espécie (Hochereau, 1963). Apesar de pouco conclusivos, relatos na literatura indicam que as frequências dos estádios podem ser alteradas por fatores tais como o uso de drogas (Rosiepen et al., 1995; Brilhante et al., 2012) e aquecimento do testículo (Chowdhury e Steinberger, 1964). Os animais do presente estudo foram submetidos às mesmas condições, de modo que a flutuações observadas quanto à distribuição das frequências dos estádios nas linhagens mutantes poderiam ser explicadas, pelo menos em parte, à característica genética dos mesmos. Evidências na literatura sugerem que a frequência dos estádios, agrupada em fases de

acordo com a ocorrência da meiose, pode ser determinada filogeneticamente entre membros da mesma família, em mamíferos (França & Russell, 1998; Almeida et al., 2006; Costa et al., 2008; Leal & França, 2008; Cordeiro Junior, 2009; Soares et al., 2009; Silva et al., 2009). Assim, para a maioria das espécies de roedores já investigadas, a fase pré-meiótica corresponde a 20-30% do total do ciclo, enquanto a fase pós-meiótica ocupa 60-70% (Cordeiro Junior, 2009). Neste contexto, apesar das variações observadas no presente estudo quanto à distribuição da frequência de estádios nas linhagens investigadas, o padrão típico de roedores foi mantido após o agrupamento em fases pré e pós-meióticas.

A proliferação e apoptose correspondem a mecanismos que controlam o número de células espermatogênicas suportadas pelas células de Sertoli, garantindo a homeostase do processo espermatogênico. Além disso, estes mecanismos podem traduzir uma competição por fatores importantes para a manutenção das células germinativas durante a espermatogênese (Jacobson et al., 1997; De Rooij, 1998). Neste contexto, a contagem e índices celulares em estádios específicos do CES fornecem substratos para se avaliar detalhadamente a espermatogênese nas diferentes espécies. Objetivamente, o índice meiótico (número de espermátides arredondas formadas a partir de espermátócitos primários em paquítenos) e a capacidade de suporte da célula de Sertoli (número de células germinativas por célula de Sertoli) possibilitam a avaliação das perdas celulares (apoptose) que ocorrem durante a fase meiótica e a estimativa da eficiência espermatogênica (França & Russell, 1998; Johnson et al., 2000; Hess & França, 2007; Soares, 2009). Neste contexto, as perdas celulares durante a fase meiótica em camundongos, variam entre 30 e 43% (Clermont & Trott, 1969; Avelar et al., 2004). Assim, observou-se que em *scid* há uma perda maior de células espermatogênicas durante a meiose (48%) estando este valor acima do intervalo considerado para esta espécie. Este dado é corroborado pela literatura, a qual descreve maior número de apoptose em espermátócitos em paquíteno do estágio IV para camundongos que carregam uma mutação do gene *Prkdc* (Hamer et al., 2003; De Rooij & De Boer, 2003). Paralelamente, as células de Sertoli de camundongos *scid* apresentaram uma capacidade de suporte inferior (7,9) àquela esperada para camundongos e demais roedores já investigados (Clermont & Harvey, 1965; Clermont & Trott, 1969; Sinha Hikim et al., 1988; Van Haaster & De Rooij, 1993; Paula et al., 1999; Rocha et al., 1999; Avelar et al., 2004; Segatelli et al., 2004; França, 2007; Leal & França, 2008 e 2009; Cordeiro Júnior, 2009; Cordeiro Júnior et al, 2009; Costa & França, 2009).

Em mamíferos o número de células de Sertoli por testículo é estabelecido durante o período pré-púbere (Orth, 1993; França et al., 2000), fase na qual se observa intensa atividade proliferativa destas células, regulada principalmente pelo FSH e hormônios tireoidianos (Orth, 1993; Cooke et al., 1994; França et al., 2000; Holsberger et al., 2003). Além disso, tem sido atribuído aos andrógenos importante papel na determinação do número de células de Sertoli durante as fases fetal (Scott et al., 2007) e pós-natal (Sharpe et al., 2003, Auharek et al., 2010) em roedores. Embora o perfil hormonal de camundongos mutantes para a DNA-PKc não tenha sido relatado para nenhuma fase do desenvolvimento pós-natal, o maior número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo encontrado para os camundongos *scid*, demonstra claramente a maior atividade proliferativa desta importante célula somática do testículo. A avaliação indireta da ação de andrógenos através de qPCR e imunohistoquímica com quantificação de pixels para o receptor de andrógeno, indicou marcação mais intensa nos testículos de camundongos imunodeficientes *scid* adultos. Ademais, o maior número dessas células poderia também estar relacionado a um aumento no seu período de proliferação, que em camundongos termina por volta de 15 dias após o nascimento (Holsberger et al., 2005). Em decorrência do maior número de células de Sertoli e comprimento tubular total, e da correlação positiva que existe entre estes parâmetros e a produção espermática diária, a linhagem *scid* mostrou melhor eficiência espermatogênica (produção espermática diária por grama de testículo), embora o valor encontrado de ~44 milhões esteja dentro do intervalo considerado para camundongos (Clermont & Trott, 1969; Avelar et al., 2004).

Os andrógenos secretados pelas células de Leydig são responsáveis pelo desenvolvimento do trato genital, aparecimento dos caracteres sexuais secundários e pela manutenção do processo espermatogênico e da função e estrutura das glândulas sexuais acessórias (Sharpe, 1994; Pelleniemi et al., 1996). De maneira geral, existe uma grande variação no volume individual da célula de Leydig, estando o valor observado para a maioria dos mamíferos já investigados situado entre 1000 e 2000  $\mu\text{m}^3$  (Almeida, 2002). No presente estudo, o volume da célula de Leydig na linhagem *nude* correspondeu a ~43% do selvagem, encontrando-se, portanto, abaixo do patamar inferior esperado para camundongos (Clermont e Trott, 1969; Avelar et al., 2004). Assim, é importante ressaltar que entre as várias espécies e linhagens de roedores já investigadas no Laboratório de Biologia Celular (Paula et al., 1999; Avelar et al., 2004;

Leal e França, 2008; Cordeiro Júnior, 2009; Costa, 2009), o valor encontrado para *nude* ( $\sim 619 \mu\text{m}^3$ ) foi superior apenas ao de *O. nigripes* ( $393 \mu\text{m}^3$ ).

À semelhança do que ocorre com o volume celular individual, também o número de células de Leydig é bastante variado entre as espécies de mamíferos, de modo que o número de células de Leydig por grama de testículo situa-se entre 20 – 40 milhões (Russell, 1996; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). Particularmente em camundongos *nude*, estudos qualitativos mostraram que o número de células de Leydig encontra-se diminuído aos 20 dias de idade, porém atingindo distribuição semelhante ao camundongo normal após o estabelecimento da puberdade (Rebar et al., 1982). No presente estudo, ao contrário, observou-se que em camundongos *nude* adultos a população de células de Leydig equivale a 4 vezes o número desta célula em camundongos selvagens. Corroborando a este achado, correlação negativa entre o volume celular individual e o número de células de Leydig por grama de testículo foi encontrada em *nude*, seguindo a tendência observada para roedores, na qual as espécies cujo volume individual estava dentro de um patamar superior, a eficiência espermato gênica era menor (Cordeiro Junior, 2009). Embora com uma amplitude mais baixa, o mesmo foi observado para os camundongos imunodeficientes *scid*.

Estudos correlacionando a estrutura e a função da célula de Leydig em várias espécies de mamíferos mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual dessa célula em secretar este andrógeno do que de diferenças no volume total das mesmas no testículo (Ewing et al., 1979). Neste contexto, as células de Leydig dos camundongos *nude* parecem ser menos eficientes na produção dos esteróides sexuais, particularmente a testosterona, uma vez que os níveis deste andrógeno permanecem diminuídos nestes animais inclusive durante a idade adulta (Rebar et al., 1982). O LH é o principal fator estimulador da função das células de Leydig (Keeney et al., 1988), contudo, estudos em ratos demonstraram que esta gonadotrofina é essencial para a expressão da enzima P450c17, mas não para a 3beta-HSD (Keeney et al., 1988). Ainda, sabe-se que os camundongos mutantes para o gene *Foxn1* apresentam também níveis reduzidos de gonadotrofinas (Rebar et al., 1982). Neste sentido, o fato de no presente trabalho ter-se encontrado maior conteúdo de mRNA para a enzima esteroideogênica 3beta-HSB pode sugerir uma tentativa de compensação para melhor aproveitamento do substrato disponível, ou seja a pregnenolona, uma vez que a via adicional dependente da P450c17 pode não estar contribuindo para a esteroideogênese. A aromatase corresponde à enzima fundamental

para a conversão de testosterona em estradiol, estando alocada no citoplasma da célula de Leydig e sua síntese controlada principalmente pelo LH (Genissel et al., 2001). O surpreendente aumento desta enzima em camundongos *nude* poderia corresponder a um efeito compensatório a fim de garantir os níveis de estrógeno adequados à função testicular.

É importante ressaltar que as diferenças encontradas entre os valores obtidos por quantificação da expressão imunohistoquímica e qPCR para as enzimas aromatase e 3beta-HSD estão associadas às diferentes técnicas utilizadas. O método de imunohistoquímica permite visualizar a expressão celular de proteínas e a quantificação de sua expressão se dá pela intensidade de pixels, enquanto o método de qPCR quantifica a expressão de mRNA em um órgão avaliado. Sendo assim, os níveis de detecção de cada um dos métodos, bem como sua sensibilidade determinam as diferenças observadas.

No presente trabalho observou-se pela primeira vez a expressão da proteína Foxn1 nos testículos de camundongos BALB/c selvagens. Através de imunohistoquímica, foi possível observar que a proteína Foxn1 parece ser produzida no citoplasma das células de Leydig e também é expressa no núcleo destas células. Por ser um fator de transcrição, o Foxn1 atua no núcleo celular regulando a expressão de diversos genes. Nesse contexto, encontrou-se expressão citoplasmática para as três linhagens investigadas, sendo que a expressão nuclear apenas não foi observada nos camundongos *nude*. Esses camundongos mutantes possuem uma deleção de um único par de base (G) no exon 3 do gene *Foxn1*, gerando um *stop* códon prematuro que resulta numa proteína Foxn1 que termina antes do domínio de ligação ao DNA. Neste sentido, apesar da presença da proteína, conforme observado através da marcação imunohistoquímica positiva para a Foxn1 no citoplasma das células de Leydig de camundongos *nude*, a mesma expressão não pode ser observada no núcleo, uma vez que essa proteína não é ativa nessa linhagem específica de camundongos. Diante disso, a distribuição citoplasma/núcleo encontrada para o fator de transcrição Foxn1 nas linhagens selvagem e *scid* sugere sua participação na regulação gênica das células de Leydig. Assim, o fator de transcrição Foxn1 poderia atuar de maneira direta ou mesmo indireta, na regulação da via esteroidogênica. Outro importante aspecto que deve ser ressaltado com relação aos animais mutantes Foxn1 é a ausência do timo, uma vez que este órgão, a partir do fator timulina, tem sido implicado à regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Daneva et al, 1995; Goya et al, 2007; Reggiani et al., 2009), desempenhando um

importante papel na estimulação da síntese de testosterona via LH em ratos a partir de 6 semanas pós-natal (Wise, 1998). Embora esta via de síntese de testosterona envolvendo timulina e LH não tenha sido detalhada para camundongos, dados encontrados no presente estudo, como por exemplo, o número de célula de Sertoli, poderiam indicar a conservação deste mecanismo.

A enzima DNA-PK desempenha um importante papel no reparo de quebras das fitas duplas de DNA nas células somáticas. Nos testículos, está associada particularmente com a manutenção da integridade do genoma, onde atua como uma “guardiã” durante a fase meiótica da espermatogênese, de maneira independente de outras proteínas de reparo de DNA, além de participar ativamente do complexo de reparo das fitas duplas de DNA em espermatogônias expostas à radiação (Hamer et al., 2003; Ahmed et al., 2007). Assim, a presença da proteína DNA-PKc já foi descrita no núcleo de células da linhagem germinativa e citoplasma das células de Sertoli e Leydig (Goedecke et al., 1999; Hamer et al., 2003). Neste contexto, os achados do presente estudo corroboram a participação das células de Sertoli e de Leydig na síntese da subunidade catalítica da enzima de reparo, uma vez que a proteína foi encontrada distribuída apenas no citoplasma dessas células somáticas. À semelhança do mecanismo de mutação que afeta o gene *Foxn1*, a mutação no gene *Prkdc* também gera um *stop* códon prematuro, de modo que a proteína é sintetizada, e apesar de se acumular no citoplasma como nas demais linhagens, é inativa nos camundongos portadores do fenótipo *scid* (Bosma et al., 1989).

Em síntese, os resultados obtidos no presente estudo possibilitaram a melhor compreensão da função testicular dos camundongos com fenótipo imunodeficiente *nude* e *scid*. Neste contexto, foi demonstrado pela primeira vez, a partir de dados histomorfométricos, que as proteínas Foxn1 e DNA-PKc poderiam desempenhar um papel na manutenção da função e estrutura testiculares normal. Assim, pelo fato da linhagem imunodeficiente *scid* ter apresentado variações significativas quanto ao número de células de Sertoli, poderia ser considerada como um modelo em potencial para o estudo mais detalhado da biologia desta importante célula somática do testículo durante as fases perinatal e pós-natal. Por outro lado, os camundongos *nude* se caracterizaram como modelos interessantes para o estudo do papel do timo na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e sua relação com a regulação da função e proliferação das células de Leydig. Em conclusão, a partir dos dados apresentados, ficou demonstrado que as linhagens imunodeficientes *nude* e *scid* apresentam características



testiculares que as tornam modelos importantes para se investigar os mecanismos de regulação do testículo, particularmente as vias e fatores que, durante o desenvolvimento pós-natal, estariam desempenhando um papel no controle da proliferação das células de Sertoli e de Leydig em mamíferos.

## 9. REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec.* 94(2):238-248. 1946.

AHMED EA, VAN DER VAART A, BARTEN A KAL HB, CHEN J, LOU Z, MINTER-DYKHOUSE K, BARTKOVA J, BARTEK J, DE BOER P, DE ROOIJ DG. Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1. *DNA Repais (Amst)*. 6(9):1243-54. 2007.

ALMEIDA FFL. Estrutura e função testiculares em javalis (*Sus scrofa scrofa*) sexualmente maduro. Dissertação mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. 2002.

ALMEIDA FFL, LEAL MC, FRANÇA LR. Testis morphometry, duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in the Wild Boar (*Sus crofa scrofa*). *Biol Reprod.* 75(5):792-799. 2006.

ALTEN HE, GROSCURTH P. The postnatal development of the ovary in the “nude” mouse. *Anat Embryol (Berl)*. 6;148(1):35-46. 1975.

AMANN RP & ALMQUIST JO. Reproductive capacity of dairy bulls. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J Dairy Sci.* 45:774-781. 1962.

AMANN RP. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparison between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. *Fertil Steril.*, v. 21, n. 1, p. 662-72, 1970.

AMANN RP & SCHANBACHER BD. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci.*; 2:380-403. 1983.

ATANASSOVA NN, WALKER M, MCKINNELL C, FISHER JS & SHARPE RM. Evidence that androgens and oestrogens, as well as folliclestimulating hormone, can alter Sertoli cell number in the neonatal rat. *J Endocrinol.* 184, 107–117. 2005.

ATTAL J & COUROT M. Developement testiculaire et etablisement de la spermatogenese chez le taureau. *Ann. Biol. Anim Bioch Biophys.* 8(3):219-241. 1963.

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

AUHAREK SA, FRANÇA LR, McKINNELL C, JOBLING MS, SCOTT HM, SHARPE RM. Prenatal plus portnatal exposure to Di(n-Butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduces final sertoli cell number in the rat. *Endocrinology.* 151(6):2868-75. 2010.

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

AVELAR GF, LEAL MC, FRANÇA LR. Sertoli and Leydig cells number per testis and daily sperm production in different mice strains. In: 13<sup>th</sup> EUROPEAN WORKSHOP ON MOLECULAR & CELLULAR ENDOCRINOLOGY OF THE TESTIS, 2004, Dunblane, Scotland. *Programme & Miniposters:* n. H1, 2004.

BAKER PJ, O'SHAUGHNESSY PJ. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction.* 122(2): 227-34. 2001.

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

BERNDTSON WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J.Anim. Sci.* 44: 818-883. 1977.

BLACKWELL TK, MALYNN BA, POLLOCK RR, FERRIER P, COVEY LR, FULOP GM, PHILIPS RA, YANCOPOULOS GD, ALT FW. Isolation of scid pre-B cells that rearrange kappa light chain genes: formation of normal signal and abnormal coding joins. *EMBO J.* 8(3):735-42. 1989.

BOSMA GC, CUSTER RP, BOSMA MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature.* 301:527-30. 1983.

BOSMA GC, DAVISSON MT, RUETSCH NR, SWEET HO, SCHULTZ LD, BOSMA MJ. The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromorome 16. *Immunogenetics.* 29:54-57.1989.

BOSMA MJ, CARROLL AM. The scid mice mutant: definition, characterization, and potencial uses. *Ann Rev Immunol.* 9:323-350.1991.

BREMNER WJ, MILLAR MR, SHARPE RM, SAUNDERS PT. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology,* 135:1227-1233. 1994.

BRILHANTE O, OKADA FK, SASSO-CERRI E, STUMPP T, MIRAGLIA SM. Late morfofunctional alterarions of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 11:10-79. 2012.

BRISSETTE JL, LI J, KAMIMURA J, LEE D, DOTTO GP. The product of the mouse nude locus, Whn, regulates the balance between epithelial cell growth and differentiation. *Genes Dev.* 10: 2212–2221. 1996.

BRÜNNER N, SPANG-THOMSEN M, BENNETT P, NIELSEN S, NIELSEN J. Serum steroid levels in intact and endocrine ablated BALB/c nude mice and their intact littermates. *J. Steroid. Biochem.* 25: 429-432. 1986.

- BUNDY DC. Photographic emulsions and processing. In: STUMPF WE, SOLOMON HF, (Eds). *Autoradiography and Correlative Imaging*. San Diego: Academic Press; p. 49–57. 1995.
- BYRD LG. Regional localization of the *nu* mutation on mouse chromosome 11. *Immunogenetics*. 37: 157–159. 1993.
- CHOWDHURY AK, STEINBERGER E. A quantitative study of the effect of heat on germinal epithelium of rat testes. *Am J Anat*. 115:509-24. 1964.
- CLERMONT Y, HARVEY SC. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rat. *Endocrinology*. 57, 369-82, 1955.
- CLERMONT Y, TROTT M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fert. Steril.*, 20(5): 805-17, 1969.
- CLERMONT Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial review. *Physiol. Rev*. 52:198- 236. 1972.
- COLLETA HHMD, CARVALHO HF. Célula de Sertoli. In: Carvalho HF, Collares-Buzaro CB. (Org.). *Células: uma abordagem multidisciplinária*. 1ed. Barueri-SP. Manole Ltda, Cap 25, p325-334, 2005.
- CORDEIRO JUNIOR DA. Estrutura e função testiculares em roedores silvestres das famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys migripes*), da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça – MG. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 2009.
- CORDEIRO JUNIOR DA, COSTA GMJ, TALAMONI SA, FRANÇA LR. Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae), *Anim. Reprod. Sci.*, 2009.

CORDIER AC, HEREMANS JF. Nude mouse embryo: Ectodermal nature of the primordial thymic defect. *Scand. J. Immunol.* 4: 193-196. 1975.

COSTA GMJ. Estudo comparativo da função testicular e eficiência espermatogênica em três diferentes espécies de mamíferos silvestres com potencial interesse econômico. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2009.

COUROT M et al. Spermatogenesis. In: JOHSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (Eds.). *The testis*. New York: Academic Press. 339-432. 1970.

DE GENDT K, SWINNEN JV, SAUNDERS PT, SCHOONJANS L, DEWERCHIN M, DEVOS A, TAN K, ATANASSOVA N, CLAESSENS F, LÉCUREUIL C, HEYNS W, CARMELIET P, GUILLOU F, SHARPE RM, VERHOEVEN G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci*, v. 101, p.1327-32, 2004.

DANEVA T, SPINEDI E, HADID R, GAILLARD RC. Impaired hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in Swiss nude athymic mice. *Neuroendocrinology*. Jul;62(1): 79-86, 1995.

DE ROOIJ DG. Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol* 79 (2), 67-80. 1998.

DE ROOIJ DG, DE BOER P. Specific arrest of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet Genome Res.* 103:267-76. 2003.

EATON GJ. Hair growth cycles and wave patterns in 'nude' mice. *Transplantation.* 22: 217-222. 1976.

EWING LL, ZIRKIN BR, COCHRAN RC, KROMANN N, PETERS C, RUIZ-BRAVO N. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology.* 105(5):1135-42. 1979.

FABRE KM, RAMAIAH L, DREGALLA RC, DESAINTE C, WEIL MM, BAILEY SM, ULLRICH RL. Murine Prkdc polymorphisms impact DNA-PKcs function. *Radiat Res.* 175(4):493-500. 2011.

FLANAGAN SP. 'Nude' a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.* 8: 295–309. 1966.

FRANÇA LR. *Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau*.185p.Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, Brasil. 1991.

FRANÇA LR. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 12, Netherlands. *Proceed*; 1716-1718. 1992.

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

FRANÇA LR, BECKER-SILVA SC, CHIARINI-GARCIA H. The length of the seminiferous cycle in goats (*Capra hircus*). *Tissue & Cell.* 31:274-280. 1999.

FRANÇA LR, SILVA JR, CHIARINI-GARCIA H. The length of the changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol. Reprod.* 63:1929-36. 2000.

FRANÇA LR & GODINHO CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*; 68(5):1554-1561. 2003.

FRANÇA LR, CHIARINI-GARCIA H. Célula de Sertoli. In: Carvalho HF, Collares-Buzaro CB. (Org.). Células: uma abordagem multidisciplinária. 1ed. Barueri-SP. Manole Ltda, Cap 24, p303-324. 2005.

GENISSEL C, LEVALLET J, CARREAU S. Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression. in adult rat Leydig cells: comparison with estradiol production. *J Endocrinol.* 168(1):95-105. 2001.

GERSHWIN ME, MERCHANT B, HELFAND MC, VICKERS J, STEINBERG SD, HANSEN CT. The natural history and immunopathology of outbred athymic (nude) mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 4: 324-340. 1975.

GITLIN D, JANEWAY CA, APT L, CRAIG JM. Agammaglobulinemia. In: LAWRENCE, H.S. (Ed.). Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitivity State, p 375-437. New York: Hoeber-Harper. 1959.

GLANZMANN E, RINIKER P. Essentielle lymphocytopenie. Ein neues Krankheitsbild aus der Säuglingspathologie. *Ann Paediatr.* 175:1-32. 1950.

GODINHO, CL. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1999.

GOEDECKE W, EIJIPE M, OFFENBERG HH, VAN AALDEREN M, HEYTING C. Mre11 and Ku70 interact in somatic cells but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet.* 23(2):194-8. 1999.

GOYA RG, REGGIANI PC, VESENBECKH SM, PLÉAU JM, SOSA YE, CÓNSOLE GM, SCHADE R, HENKLEIN P, DARDENNE M. Thymulin gene therapy prevents the reduction in circulating gonadotropins induced by thymulin deficiency in mice. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 293:E182–E187, 2007.

GRISWOLD MD. Action of FSH on mammalian Sertoli cells. In: RUSSELL LD, GRISWOLD MD, editors. The Sertoli cell. Clearwater: Cache River Press. p.493–508. 1993.



HAMER G, ROEPERS-GAJADIEN HL, VAN DUYN-GOEDHART A, GADEMAN IS, KAL HB, VAN BUUL PPW, DE ROOIJ DG. Dna double-strand breaks and  $\gamma$ H2AX in the testis. *Biol Reprod.* 689(2):628-34.2003.

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

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

HITZIG WH, BINT Z, BOSCH H, HUSER HJ. Agammaglobulinämie und Alympocytose mit Schwund des lymphatischen Gewebes. *Helv Paediat Acta.* 13:551-85. 1958.

HOCHEREAU, M.T. Constance des frequencias relatives des stades du cycle de l'epithelium seminifere chez le taureau et chez le rat. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*3:93-102, 1963.

HOLSBERGER DR, JIRAWTNOTAI S, KIYOKAWA H, COOKE PS. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology.* 144:3732-38. 2003.

HOLSBERGER DR, BUCHOLD GM, LEAL MC, KIESEWETTER SE, O'BRIEN DA, HESS RA, FRANÇA LR, KIYOKAWA H, COOKE PS. Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biol Reprod.* 72(6):1429-36. 2005.

JACOBSON MD, WEIL M, RAFF MC. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 88 (3), 347-54. 1997.

JOHNSON L, VARNER DD, ROBERTS ME, SMITH TL, KEILLOR GE, SCRUTCHFIELD WL. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci* 60-61, 471-80. 2000.

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

KEENEY DS, MENDIS-HANDAGAMA SMLC, ZIRKIN BR, EWING LL. Effect of long term deprivation of luteinizing hormone on Leydig cell volume, Leydig cell number and steroidogenic capacity of the rat testis. *Endocrinology*. 123:2906-15. 1988.

LEAL MC. Análise morfométrica e funcional do testículo e eficiência espermatogênica em sagüis *Callithrix penicillata* (Primates: Callitrichidae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 2004.

LEAL MC, BECKER-SILVA SC, CHIARINI-GARCIA H, FRANÇA LR. Sertoli cell efficiency and daily sperm production in goats (*Capra hircus*). *Anim Reprod*; 1(1):122-128. 2004.

LEAL MC & FRANÇA LR. The seminiferous epithelium cycle in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biol Reprod*; 74 (4):616-624. 2006.

LEAL MC & FRANÇA LR. Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanígera*. *Theriogenology* 20, 665-73. 2008.

LEBLOND CP, CLERMONT Y. Definition of the stages of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55:548-573. 1952.

LEE DK, CHANG C. Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(9):4043-54. 2003.

LIEBER MR, HESSE JE, LEWIS S, BOSMA GC, ROSENBERG N, MIZUUCHI K, BOSMA MJ, GELLERT M. Abnormal V(D)J recombination in murine severe combined immune deficiency: absence of coding joints and formation of alternative products. *Curr Top Microbiol Immunol.* 152:69-75. 1989.

LIEBER MR, HESSE JE, LEWIS S, BOSMA GC, ROSENBERG N, MIZUUCHI K, BOSMA MJ, GELLERT M. The defect in murine severe combined immune deficiency: joining of signal sequences but not coding segments in V(D)J recombination. *Cell.* 55(1):7-16. 1988.

LISITSYN AN, Segre JA, Kusumi K. Direct isolation of polymorphic markers linked to a trait by genetically directed representational difference analysis. *Nat Genet.* 6: 57–63. 1994.

MALYNN BA, BLACKWELL TK, FULOP GM, RATHBUN GA, YANCOPOULUS GD, ALT FW. The scid defect affects the final step of the immunoglobulin VDJ recombinase mechanism. *Cell.* 54:453-460. 1988.

MASAHIRO I, YASUTAKA K, YASUKI S, YOSHIKI T. Spontaneous degeneration of testicular germ cells in congenitally athymic nude mice of four strains: a light microscopical observation. *J. Androl.* 18:672-680. 1997.

McCOARD SA, WISE TH, LUNSTRA DD, FORD JJ. Stereological evaluation of sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine. *J Endocrinol.* 178(3): 395-403. 2003.

MECKLENBURG L, NAKAMURA M, SUNDBERG JP, PAUS R. The nude mouse skin phenotype: the role of Foxn1 in hair follicle development and cycling. *Exp Mol Pathol.* 71: 171–178. 2001.

NAGASAWA H, YANAI R. Mammary growth and function and pituitary prolactina secretion in female nude mice. *Acta Endocrinol (Copenh).* 86(4):794-802. 1977.

NEHLS M, KYEWSKI B, MESSERLE M, WALDSCHÜTZ R, SCHÜDDEKOPF K, SMITH AJ, BOEHM T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science*. 272: 886–889. 1996.

NEHLS M, PFEIFER D, SCHORPP M, HEDRICH H, BOEHM T. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature*. 372: 103–107. 1994.

NEVES ES, CHIARINI-GARCIA H, FRANÇA LR. Seminiferous epithelium cycle length in donkeys. In: International Congress of Andrology, 7., 2001, Montreal. Abstracts. Montreal: American Society of ANdrology. P. 158. 2001.

NEVES ES, CHIARINI-GARCIA H, FRANÇA LR. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol Reprod*, 67(1):247-255. 2002.

NOWELL CS, BREDENKAMP N, TETÉLIN S, JIN X, TISCHNER C, VAIDYA H, SHERIDAN JM, STENHOUSE HF, HEUSSEN R, SMITH AJH, BLACKBURN CC. Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence. *PLoS Genet*. 7(11):e1002348. 2011.

OAKBERG EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am. J. Anat.*, 99(3): 507-16, 1956.

O'KEANE JC, BRIEN TG, HOOPER AC, GRAHAM A. Testicular activity in mice selected for increased body eight. *Andrologia*. 18(2): 190-5. 1986.

OKWUN OE, IGBOELI G, LUNSTRA DD. Testicular composition, number of A spermatogonia, germ cell ratios and number of spermatids in three different breeds of boars. *J. Androl.*, 17, 3, 301-8. 1996.

OLSEN NJ, OLSON G, VISELLI SM, GU X, KOVACS WJ. Androgen receptors in thimic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology*. 142(3): 1278-1283. 2001.

ORTAVANT R, COUROT M; HOCHEREAU-DE-REVIERS, MT. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. (Eds). Reproduction in domestic mammals. New York: Academic Press. 203-227. 1977.

ORTH JM. The role of the follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*. 115:1248-1255. 1984.

ORTH, JM. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: DESJARDINS, C.; EWING, L.L. (Eds.). Cell and molecular biology of the testis. New York: Oxford University Press. 3-42. 1993.

O'SHAUGHNESSY PJ. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 1084-9521(14)00022-6. 2014. [Epub ahead of print]

PANTELOURIS EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*. 217: 370–371. 1968.

PANTELOURIS EM. Athymic development in the mouse. *Differentiation* 1:437-450. 1973.

PAULA TAR, CHIARINI-GARCIA H, FRANÇA LR. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrocoerus hydrochaeris*). *Tissue & Cell*. 31: 327-34. 1999.

PAUS R, MULLER-ROVER S, VAN DER VEEN C, MAURER M, EICHMÜLLER S, LING G, HOFMANN U, FOITZIK K, MECKLENBURG L, HANDJISKI B. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol*. 113: 523–532. 1999.

PAYNE AH, O'SHAUGHNESSY PJP. Structure, function and regulation of steroidogenic enzymes in the Leydig cell. In: Payne AH, Hardy MP, Russel LD. The Leydig cell. 1ed. Vienna, IL. Cache River Press, 1996, Cap 12, p259-286.

PELLINIEMI LJ, KUOPIO T, FROJDMAN K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE A.H., HARDY M.P., RUSSELL L.D. (Eds). *The Leydig Cell*. Ed. Cache River Press. Vienna. p.143-157, 1996.

PERRYMAN LE. Molecular pathology of severe combined immunodeficiency in mice, horses and dogs. *Vet Pathol.* 41(2): 95-100. 2004.

PIERPAOLI W e BESEDOVSKY HO. Role of the thymus in programming of neuroendocrine functions. *Clin. Exp. Immunol.* 20:323-338. 1975.

PUCK JM: X-linked severe combined immunodeficiency. In: OCHS, H.D.; SMITH, C.I.E.; PUCK, J.M. (Eds.); *Primary Immunodeficiency Diseases. A molecular and Genetic Approach.* chap. 8, p 99-110. Oxford University Press, New York, NY. 1999.

REBAR RW, MORANDINI IC, PETZE JE, ERICKSON GF. Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: reduced gonadotropins and testosterone in males. *Biol. Reprod.* 27:1267-1276. 1982.

REGGIANI PC, MOREL GR, CONSOLE GM, BARBEITO CG, RODRIGUEZ SS, BROWN OA, BELLINI MJ, PLÉAU JM, DARDENNE M, GOYA RG. The thymus-neuroendocrine axis: physiology, molecular biology, and therapeutic potential of the thymic peptid thymulin. *Ann N Y Acad Scid.* 1153:98-106. 2009.

ROCHA DCM, DEBELJUK L, FRANÇA LR. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. *Tissue & Cell.* 31: 372-79. 1999.

ROOSEN-RUNGE EC, GIESEL Jr LO. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am. J. Anat.* 87:1-30. 1950.

ROOSEN-RUNGE EC. *The process of spermatogenesis in mammals.* Cambridge: University Press. 1977.

ROSIEPEN G, CHAPIN RE, WEINBAUER GF. The duration of the cycle of the seminiferous epithelium is altered by administration of 2,5-hexanedione in the adult Sprague-Dawley rat. *J Androl.* 16(2):127-35. 1995.

RUITENBERG EL, BERKVENS JM. The morphology of the endocrine system in congenitally athymic (nude) mice. *J. Pathol.* 121:225-231. 1977.

RUSSEL LD & GRISWOLD MD. The Sertoli cell. (1 ed). 1993.

RUSSELL, L.D; CORBIN, TJ; BORG, KE; et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology.* 133:2062-2070. 1993.

RUSSELL, LD; ETTLIN, RA; SINHA-HIKIM, AP; CLEGG, ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press. 1990.

RYGAAR J, POVLSEN CO. Effects of homozygosity of nude (nu) gene in three inbred strains of mice. A detailed study of mice of three genetic backgrounds (BALB/c, C3H, C57BL/6) with congenital absence of the thymus (nude mouse) at a stage in the gene transfer. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 82: 48-70. 1974.

RYGAARD J, FRUS CW: The husbandry of mice with congenital absence of the thymus (nude mice). *Z Versuchstierkd* 16: 1-10. 1974.

RYGAARD J. Thymus and self. Immunobiology of the mouse mutant nude. F.A.D.L. Copenhagen. 1973.

SCHLAKE T. The nude gene and the skin. *Exp Dermatol.* 10:293-304. 2001

SCHORPP M, HOFMANN M, DEAR TN, BOEHM T. Characterization of mouse and human nude genes. *Immunogenetics.* 46: 509–515. 1997.

SCHULER W, WEILER IJ, SCHULER A, PHILIPS RA, ROSENBERG N, MAK N, KEARNEY JF, PERRY RP, BOSMA MJ. Rarrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell*. 46:963-972. 1986.

SCOTT HM, HUTCHISON GR, MAHOOD IK, HALLMAK N, WELSH M, DE GENDT K, VERHOEVEN G, O'SHAUGHNESSY P, SHARPE RM. Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. *Endocrinology*. 148: 2027-2036. 2007.

SCOTT HM, HUTCHISON GH, JOBLING MS, MCKINNELL C, DRAKE AJ, SHARPE RM. Relationship between androgen action in the 'male programming window', fetal Sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology* 149, 5280–5287. 2008.

SEGATELLI TM, ALMEIDA CCD, PINHEIRO PFF, et al. Kinetics of spermatogenesis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tiss. Cell*, 24(1): 7-13, 2002.

SEGRE JA, NEMHAUSER JL, TAYLOR BA, NADEAU JH, LANDER ES. Positional cloning of the nude locus: genetic, physical, and transcription maps of the region and mutations in the mouse and rat. *Genomics*. 28: 549–559. 1995.

SETCHELL BP, MADDOCKS S, BROOKS DE. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive. In: KNOBIL E, NEILL JD (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2 ed. New York: Raven Press, p. 1063-1175. 1994.

SETCHELL BP, BREED WG. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: *Physiology of Reproduction* (ed. Neill JD), pp. 771-825. Elsevier, 2006.

SHARPE RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL E., NEIL J.D. (Eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. p.1363-1434. 1994.



SHARPE, RM; MCKINNELL, C; KIVLIN, C; FISHER, JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 125:769-84. 2003.

SHIRE JG, PANTELOURIS EM. Comparison of endocrine function in normal and genetically athymic mice. *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* 47:93-100. 1974.

SHULTZ LD, HEINIGER HJ, EICHER EM. Immunopathology of streaker mice: a remutation to nude in the AKR/J strain. In: Gershwin M.C., (Ed.). *Animal models of comparative and developmental aspects of immunity and disease*. New York: Pergamon Press, 211. 1978.

SHUPNIK MA & SCHREIHOFFER DA. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *J Androl.* v.18, p.341-344, 1997.

SILVA RC, COSTA GMJ, ANDRADE LM, FRANÇA LR. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology*. 73(2): 157-67. 2010.

SINHA-HIKIM AP, BARTKE A, RUSSEL LD. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biol. Reprod.*, 39(5): 1225-37, 1988.

SOARES MJ. Morfometria do testículo, duração e eficiência da espermatogênese em diferentes raças de cães (*Canis familiaris*). Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 2009.

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

TAKAHASHI Y, SHIMIZU A, SAKAI T, ENDO Y, OSAWA N, SHISA H, HONJO T. Mapping of the *nu* gene using congenic nude strains and in situ hybridization. *J Exp Med.* 175: 873–876. 1992.

VAN HAASTER LH, DE ROOIJ DG. Cycle of the seminiferous epithelium cycle in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus sungorus*). *Biol. Reprod.*, 48(3): 515-21, 1993.

WISE T. In vitro and in vivo effects of thymulin on rat testicular steroid synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 66(3):129-35. 1998.

YADAV SK, SHARMA AK. Seminiferous length in normal buffalos bulls and bucks. *Int J Anim Sci* 9, 293-6. 1994.

YU Y, OKAYASU R, WEIL MM, SILVER A, MCCARTHY M, ZABRISKIE R, LONG S, COX R, ULLRICH RL. Elevated breast cancer risk in irradiated BALB/c mice associates with unique functional polymorphism of the *Prkdc* (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) gene. *Cancer Res.* 61(5): 1820-4. 2001.

ZIRKIN BR, AWONIYI C, GRISWOLD MD, RUSSELL LD, SHARPE R. Is FSH required for adult spermatogenesis? *J Androl.* v.15, p.273-6, 1994.

<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>