

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal

**CINÉTICA DAS ESPERMATOGÔNIAS EM CAMUNDONGOS *KNOCKOUT Tex14*
COM AUSÊNCIA DE PONTES INTERCELULARES**

CAROLINA ANDRADE REZENDE DE MELO

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG

2016

Carolina Andrade Rezende de Melo

**CINÉTICA DAS ESPERMATOGÔNIAS EM CAMUNDONGOS *KNOCKOUT*
Tex14 COM AUSÊNCIA DE PONTES INTERCELULARES**

Tese apresentada na Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Área: Reprodução Animal

Orientador: Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Coorientador: Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2016

M528c Melo, Carolina Andrade Rezende de, 1986-
Cinética das espermatogônias em camundongos *Knockout Tex14* com ausência de pontes intercelulares / Carolina Andrade Rezende de Melo. – 2016.
45 p. : il.

Orientador: Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Coorientador: Hélio Chiarini-Garcia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Camundongo – Teses. 2. Espermatogônias – Teses. 3. Testículos – Teses.
I. Almeida, Fernanda Radicchi Campos Lobato de. II. Chiarini-Garcia, Hélio.
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.089 26

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINA ANDRADE REZENDE DE MELO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em REPRODUÇÃO ANIMAL.

Aprovada em 08 de Agosto de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof.ª. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida
Presidente - Orientador

Prof.ª. Cleida Aparecida de Oliveira
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Prof. Guilherme Mattos Jardim Costa
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta
Universidade Federal de Viçosa - UFV

Prof. Hugo Pereira Godinho
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais- PUC-MINAS

Prof. Hélio Chiarini-Garcia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG



Eu dedico:

A Jesus Cristo, Senhor e Salvador da minha vida, autor e consumador da minha fé. “Olhando para Jesus, autor e consumador da fé, o qual, pelo gozo que lhe estava proposto, suportou a cruz, desprezando a afronta, e assentou-se à destra do trono de Deus” (Hebreus 12.2).

Agradecimentos:

A Deus, minha fortaleza.

Ao meu esposo Allan e aos meus pais Hélio e Maria José. Obrigada pelo carinho, incentivo e principalmente pelo esforço para que eu chegasse até aqui. Amo vocês!

Aos meus irmãos Mateus e Isabella, a minha sogra Irlanda e a equipe do Biotério Central da UFMG. Obrigada pelo carinho e pelo incentivo.

Aos pastores Jorge Linhares, Daniel Fialho e Cleber Agapito. Obrigada pelas orações, aconselhamentos e ensinamentos da Palavra de Deus. “Lâmpada para os meus pés é tua palavra, e luz para o meu caminho” (Salmos 119:105).

A minha Professora Orientadora Fernanda Almeida e ao meu Professor Coorientador Hélio Chiarini-Garcia. Obrigada pelo carinho, respeito, ética, dedicação, ensinamentos, sábios conselhos e principalmente pela oportunidade.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução pelo acolhimento.

A Ana Luiza Alvarenga Drumond e aos Professores Marvin Meistrich e Martin Matzuk pela colaboração.

Ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. HIPÓTESE.....	12
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. OBJETIVO GERAL.....	12
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
4.1. A MORFOLOGIA DA ESPERMATOGÊNESE EM CAMUNDONGOS.....	13
4.2. PONTES INTERCELULARES: HISTÓRICO E FUNÇÃO.....	18
4.3. CITOCINESE E FORMAÇÃO DAS PONTES INTERCELULARES EM CÉLULAS GERMINATIVAS.....	19
4.4. CONSEQUÊNCIAS DA AUSÊNCIA DAS PONTES INTERCELULARES NA ESPERMATOGÊNESE DE CAMUNDONGOS <i>KNOCKOUT Tex14</i>	20
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1. ANIMAIS.....	21
5.2. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA DE LUZ DE ALTA RESOLUÇÃO (HRLM) e MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	22
5.3. MARCAÇÃO PELO BrdU.....	22
5.4. AVALIAÇÃO DO TECIDO SOB HRLM.....	23
5.5. AVALIAÇÃO DO TECIDO MARCADO PELO BrdU.....	23
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6.1. MORFOLOGIA DAS CÉLULAS GERMINATIVAS.....	25
6.2. LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS.....	29
6.3. NÚMERO E CINÉTICA DAS CÉLULAS GERMINATIVAS.....	32
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero com base no sistema espermatogonial e comparação com o sistema-padrão acrossômico.....	24
------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema representativo da fase proliferativa da espermatogênese em camundongos...	14
Figura 2 -	Desenho esquemático das associações entre células germinativas nos 12 estádios acrossômicos do ciclo do epitélio seminífero em camundongos.....	16
Figura 3 -	Morfologia das espermatogônias nos testículos de camundongos <i>knockout Tex14</i>	25
Figura 4 -	Morfologia e alterações de células germinativas em camundongos <i>knockout Tex14</i>	27
Figura 5 -	Epitélio seminífero de camundongos <i>knockout Tex14</i> nos estádios espermatogoniais 3, 6 e 1, onde são evidenciadas a morfologia e a depleção dos espermatócitos primários em paquíteno.....	28
Figura 6 -	Localização de espermatogônias e de espermatócitos primários no epitélio seminífero de camundongos <i>Tex14^{+/-}</i> e <i>Tex14^{-/-}</i>	30
Figura 7 -	Espermatócito primário em preleptóteno no ambiente intermediário do epitélio seminífero em camundongos <i>knockout Tex14</i>	31
Figura 8 -	Marcação de espermatogônias pelo BrdU no epitélio seminífero de camundongos <i>Tex14^{+/-}</i> e <i>Tex14^{-/-}</i>	32
Figura 9 -	Cinética das espermatogônias em camundongos <i>Tex14^{+/-}</i> e <i>Tex14^{-/-}</i> ao longo dos estádios espermatogoniais.....	33
Figura 10 -	Distribuição de cada tipo de espermatogônia diferenciada e de espermatócito primário ao longo dos estádios espermatogoniais em camundongos <i>Tex14^{+/-}</i> e <i>Tex14^{-/-}</i>	35
Figura 11 -	Cinética dos espermatócitos primários em camundongos <i>Tex14^{+/-}</i> e <i>Tex14^{-/-}</i> ao longo dos estádios espermatogoniais.....	36
Figura 12 -	Índices mitótico e apoptótico gerais e ao longo dos estádios espermatogoniais nos camundongos <i>Tex14^{+/-}</i> e <i>Tex14^{-/-}</i>	38
Figura 13 -	Índices de marcação de espermatogônias pelo BrdU nos camundongos <i>Tex14^{+/-}</i> e <i>Tex14^{-/-}</i>	38
Figura 14 -	Assincronismo das células germinativas na ausência de pontes intercelulares em camundongos <i>knockout Tex14</i>	39

RESUMO

As pontes intercelulares são canais citoplasmáticos que interconectam clones de células germinativas em um sincício. Tem sido proposto que as pontes intercelulares exercem um papel fundamental na comunicação e no sincronismo das células germinativas, mediando o trânsito de sinais apoptóticos e mitóticos entre os clones de espermatogônias e coordenando a entrada em meiose. Camundongos *knockout Tex14* são geneticamente incapazes de produzir a proteína TEX14. Essa proteína é essencial para a manutenção das pontes intercelulares e sua ausência resulta em esterilidade. Estudos prévios em camundongos *knockout Tex14* não investigaram, por abordagens morfológicas, detalhes dos papéis propostos atribuídos às pontes intercelulares. Assim, o presente estudo avaliou a participação das pontes intercelulares no sincronismo do epitélio seminífero usando microscopia de luz de alta resolução, imunohistoquímica (bromodeoxiuridina – BrdU – para detecção de células proliferativas em tecidos vivos) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A morfologia espermatogonial não foi afetada pela ausência de pontes intercelulares, mas a cinética espermatogonial foi comprometida na proliferação das espermatogônias $A_{\text{indiferenciadas}}$, que originam o estoque comprometido a se diferenciar em A_1 , e das espermatogônias B, que originam o grupo de espermatócitos comprometidos com a meiose. Algumas espermatogônias B e espermatócitos em preleptóteno foram vistos afastados da lamina basal e outros no compartimento intermediário. Na transição das fases proliferativa e meiótica, houve um primeiro momento de apoptose que reduziu o número de espermatócitos primários em preleptóteno. Depois, os espermatócitos primários em paquíteno foram completamente eliminados a partir do estágio espermatogonial 5. Os resultados confirmam a importância das pontes intercelulares na sincronização das células germinativas e coordenação de eventos críticos como diferenciação em A_1 e meiose.

Palavras-chave: testículos, pontes intercelulares, espermatogônias, cinética, TEX14.

ABSTRACT

Intercellular bridges are cytoplasmic channels that interconnect clones of germ cells in a syncytium. It has been predicted that the intercellular bridges have a fundamental role in the communication and synchronization of the germ cells, mediating the transit of apoptotic and mitotic signals between spermatogonial clones and for coordinating the entry into meiosis. *Tex14* knockout mice are genetically unable to produce the protein TEX14. This protein is essential for the maintenance of the intercellular bridges and its absence results in sterility. Previous studies on *Tex14* knockout mice did not investigate details of the proposed roles attributed to the intercellular bridges by morphological approaches. Hence, the present study evaluated the intercellular bridges participation in the seminiferous epithelial synchronism using high-resolution light microscopy (HRLM), immunohistochemistry (bromodeoxyuridine – BrdU – for detection of proliferating cells in living tissues) and transmission electron microscopy (TEM). The spermatogonial morphology was not affected by the lack of intercellular bridges, but spermatogonial kinetics was impaired in the proliferation of the A_{undifferentiated} spermatogonia, which generate the pool committed to differentiate to A₁, and B spermatogonia, that generate the pool of spermatocytes committed to meiosis. Some B spermatogonia and the preleptotene spermatocytes were seen far from the basal lamina and others in the intermediated compartment. In the transition of proliferative and meiotic phases, there was a first moment of apoptosis that reduced the number of preleptotene primary spermatocytes. Afterwards, pachytene primary spermatocytes were completely depleted from spermatogonial stage 5 onwards. The results confirm the importance of intercellular bridges in the synchronization of the germ cells and coordination of the critical events like differentiation into A₁ and meiosis.

Keywords: testes, intercellular bridges, spermatogonia, kinetic, TEX14.

1. INTRODUÇÃO

A citocinese é o processo de separação física do citoplasma de uma célula parental em divisão celular, que culmina com a origem de duas células-filhas individualizadas (Mishima, 2016). Esse processo é essencial para a proliferação celular e para o desenvolvimento embrionário (Mishima, 2016) e ocorre quando células somáticas ou germinativas passam pela mitose e originam duas células-filhas diploides, ou quando células germinativas passam pelas meioses I e II, e originam quatro células-filhas haploides (Cooper, 2000).

Em mamíferos machos (Greenbaum *et al.*, 2006) e fêmeas durante a fase embrionária (Greenbaum *et al.*, 2009), as células germinativas em mitose e meiose não completam a citocinese. Ao invés disso, uma conexão citoplasmática de 0,5 a 3,0 μ m de diâmetro (Weber e Russell, 1987), à qual foi atribuído o nome de ponte intercelular (Fawcett *et al.*, 1959), se mantém estável entre as células-filhas (Revisado por Greenbaum *et al.*, 2011). As células-filhas conectadas por pontes intercelulares formam sincícios, que mantêm uma cinética de diferenciação sincronizada (Fawcett, 1961; Zamboni e Gondos, 1968).

No epitélio seminífero, as pontes intercelulares permanecem conectando as células germinativas em sincícios por quase toda a espermatogênese. Prestes à ocasião da espermição, que é o processo de desprendimento dos espermatozoides do epitélio seminífero e sua liberação individual no lúmen dos túbulos seminíferos, as pontes intercelulares são eliminadas juntamente com os corpos residuais, que são porções de citoplasma de espermátides em processo final de maturação (Russell *et al.*, 1990).

Em camundongos, as espermatogônias-tronco são originadas logo após o nascimento, a partir da diferenciação dos gonócitos. Elas são conhecidas como espermatogônias do tipo A_{isolada} , devido à ausência de conexões citoplasmáticas com quaisquer outras espermatogônias. As espermatogônias-tronco são capazes de manter seu próprio estoque através do processo de autorrenovação. Alternativamente, elas podem se dividir e originar duas células-filhas conectadas por uma ponte intercelular estável (A_{pareada}). A permanência desta ponte intercelular indica que tais células iniciaram seu comprometimento com o processo de diferenciação em espermatozoides (Weber e Russell, 1987). Durante a espermatogênese de camundongos, há até dez sequências de mitoses espermatogoniais antes das meioses I e II (Chiarini-Garcia e Russell, 2002) e uma ponte intercelular se forma a cada divisão celular (Weber e Russell, 1987).

A descoberta da proteína TEX14 como componente essencial para a formação das pontes intercelulares em mamíferos (Greenbaum *et al.*, 2006) e a disponibilidade de um modelo experimental *knockout* para o gene codificador da TEX14, os camundongos *Tex14*^{-/-} (Wu *et al.*, 2003), despertaram para a possibilidade de se elucidar a função dessas estruturas secularmente instigantes.

Os estudos em camundongos *Tex14^{-/-}* mostraram que as pontes intercelulares são essenciais para a fertilidade nos machos. Sua ausência acarreta interrupção da espermatogênese na fase meiótica (Greenbaum *et al.*, 2006, 2009, 2011). Contudo, não está elucidado se tal interrupção estaria ou não relacionada à perda do sincronismo dos clones de células germinativas. A proposta de que as pontes intercelulares são fundamentais para a comunicação e o sincronismo dos clones de células germinativas vem sendo lançada há mais de meio século (Fawcett *et al.*, 1959), e segue sem comprovação.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a cinética e o sincronismo das diferentes populações de células germinativas do testículo de camundongos com ausência da proteína TEX14 (*Tex14^{-/-}*), com ênfase nas células da linhagem espermatogonial, utilizando como técnicas histológicas a microscopia de luz de alta resolução (*High Resolution Light Microscopy* - HRLM) e a imunistoquímica com BrdU.

2. HIPÓTESE

A ausência das pontes intercelulares altera a cinética e o sincronismo dos clones de células germinativas ao longo da espermatogênese.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar o comportamento das espermatogônias na ausência de pontes intercelulares.

3.2. Objetivos específicos:

Verificar se a ausência de pontes intercelulares altera a morfologia, o número, a cinética e o sincronismo das células germinativas, com ênfase nas espermatogônias;

Averiguar se a ausência de pontes intercelulares altera o número de mitoses espermatogoniais, por meio de análises morfométricas e de marcação de proliferação celular;

Avaliar se a ausência de pontes intercelulares altera o número de apoptoses de espermatogônias e espermátocitos primários em preleptóteno.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. A morfologia da espermatogênese em camundongos

O parênquima testicular de camundongos e demais mamíferos é constituído por dois compartimentos interdependentes, denominados tubular e intersticial. Basicamente, no compartimento tubular, as células de Sertoli sustentam a espermatogênese, processo de proliferação e diferenciação das células germinativas em espermatozoides. O compartimento intersticial é a principal fonte de testosterona do organismo, devido à sua produção pelas células de Leydig, sendo também responsável pela irrigação sanguínea, nutrição e defesa imune dos testículos (Russell *et al.*, 1990).

O grupo de células germinativas que compõe o epitélio seminífero de camundongos é formado, em ordem de diferenciação, por espermatogônias, espermatócitos, espermatídes, e espermatozoides (Russell *et al.*, 1990). As espermatogônias são células germinativas diploides, responsáveis pela manutenção e amplificação do número (grupo) de células germinativas comprometidas com a espermatogênese. Elas residem no ambiente basal dos túbulos seminíferos, onde têm livre acesso às substâncias provenientes da irrigação sanguínea local (de Rooij e Russell, 2000).

A espermatogônia A_{isolada} (A_{is}) é a célula-tronco responsável pela reposição do grupo de células-tronco espermatogoniais, através do processo de autorrenovação, e também por gerar as espermatogônias A_{pareadas} (A_{pr}), dando início à fase proliferativa da espermatogênese (Weber e Russell, 1987) (**Fig.1**). As espermatogônias A_{pr} consistem em um par de células-filhas conectadas por uma ponte intercelular estável. Por até quatro mitoses sucessivas, essas células geram as espermatogônias $A_{\text{alinhadas}}$ (A_{al}), formando sincícios de 4, 8, 16 e eventualmente 32 células. Nos estádios VII e VIII do ciclo do epitélio seminífero, as espermatogônias A_{al} se diferenciam sincronicamente em espermatogônias do tipo A_1 (de Rooij, 1998). Posteriormente, em prosseguimento à fase proliferativa da espermatogênese, por uma divisão mitótica as espermatogônias A_1 originam A_2 ; A_2 originam A_3 ; A_3 originam A_4 ; A_4 originam Intermediárias (In); In originam B; e B originam os espermatócitos primários (Revisado por de Rooij, 2004; Yoshida 2012).

As espermatogônias A_{is} , A_{pr} e A_{al} compõem o grande grupo das espermatogônias $A_{\text{indiferenciadas}}$ (A_{ind}). Originalmente, elas foram assim agrupadas por apresentarem características morfológicas pouco evidentes de diferenciação celular (Huckins, 1971). Mesmo utilizando método morfológico de alta resolução (Chiarini-Garcia e Russell, 2001), verificou-se que essas espermatogônias são semelhantes entre si. Seu núcleo tem formato oval ou achatado, com heterocromatina de baixa densidade, que se intervala com áreas claras de eucromatina, resultando em uma aparência “manchada”. Vacúolos nucleares podem estar presentes, bem como um ou dois nucléolos pequenos e irregulares. O citoplasma tem baixa densidade.

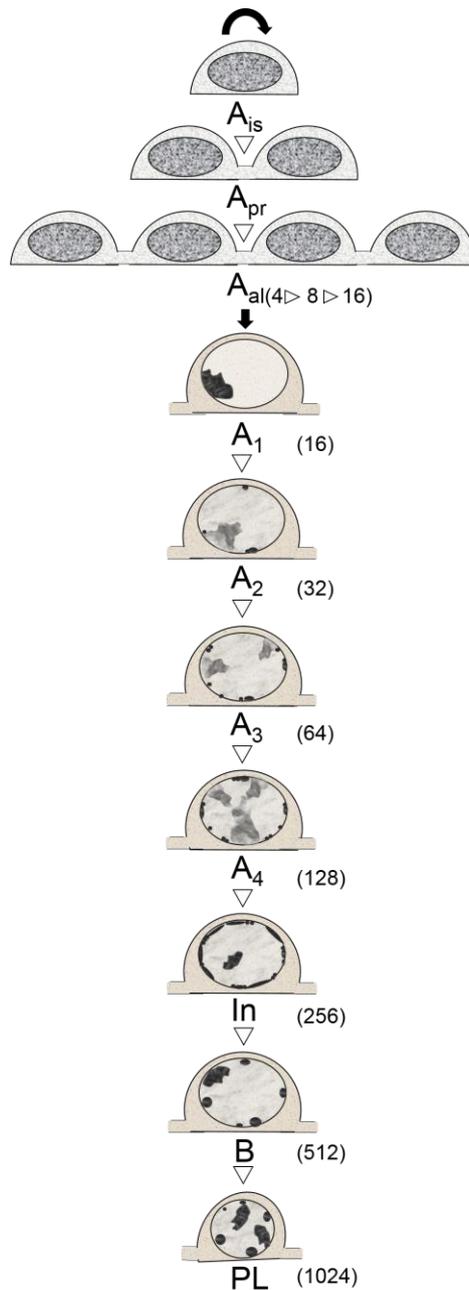


Figura 1. Esquema representativo da fase proliferativa da espermatogênese em camundongos. Essa fase é caracterizada pela amplificação do número de espermatogônias por mitoses sucessivas (cabeças-de-seta). A espermatogônia-tronco $A_{isolada}$ (A_{is}) é capaz de manter seu próprio estoque nos testículos através do processo de autorrenovação (seta curva). Alternativamente, ela origina as demais gerações de espermatogônias comprometidas com o processo de diferenciação em espermatozoides: $A_{pareadas}$ (A_{pr}), $A_{alinhadas}$ (A_{al}) em sincícios de 4, 8 e 16 células, A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , Intermediária (In) e B . Ao todo, 9 a 10 sequências de mitoses espermatogoniais resultam em até 1024 espermatócitos primários. A seta reta representa o processo de diferenciação das espermatogônias $A_{alinhadas}$ em espermatogônias A_1 , que ocorre nos estádios VII e VIII do ciclo do epitélio seminífero, e não envolve divisão celular (de Rooij e Grootegoed, 1998; de Rooij e Russell, 2000).

As demais espermatogônias compõem o grande grupo das diferenciadas, e podem ser distinguidas entre si com o uso da HRLM (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Chiarini-Garcia e Meistrich, 2008). Elas possuem núcleo com formato oval, contendo um a três nucléolos, e citoplasma de densidade baixa a moderada. Podem ser diferenciadas entre si pela quantidade de heterocromatina presente na borda interna do núcleo (**Fig.1**). Nas espermatogônias A₁, a heterocromatina é discreta e quase imperceptível. Nas espermatogônias A₂, flocos de heterocromatina ocupam menos de 10% da borda interna do núcleo. Nas espermatogônias A₃, A₄ e In, esses flocos ocupam, respectivamente, 10-25%, 30-70% e 70-100% da borda interna do núcleo. Nas espermatogônias B, flocos mais espessos e arredondados de heterocromatina se distribuem periodicamente ao longo da borda interna do núcleo (Chiarini-Garcia e Russell, 2001).

As espermatogônias A_{ind} se distribuem preferencialmente em nichos do epitélio seminífero, adjacentes a vasos sanguíneos intersticiais (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001) e coexistem com as demais células germinativas, sem especificidade. Já as espermatogônias diferenciadas são observadas em segmentos com associações celulares específicas ou estádios celulares (Meistrich e Hess, 2013). Em camundongos, o ciclo do epitélio seminífero pode ser dividido em 12 estádios com associações celulares específicas (**Fig.2**). Para a separação do processamento espermatogênico em estádios, classicamente é adotado o sistema acrossômico, que se baseia na morfologia do acrossoma das espermátides em diferenciação (Russell *et al.*, 1990).

A fase seguinte da espermatogênese é a meiótica. Os espermatócitos primários se preparam para dar início à meiose, com a imediata duplicação de seu DNA. Na microscopia de luz, essas células são observadas em preleptóteno, que é a etapa final da fase-S do ciclo celular. Quanto à sua morfologia, os espermatócitos em preleptóteno (PL) são semelhantes às espermatogônias B, porém têm diâmetro 30% menor e possuem menos heterocromatina ao longo da borda interna do núcleo (Russell *et al.*, 1990).

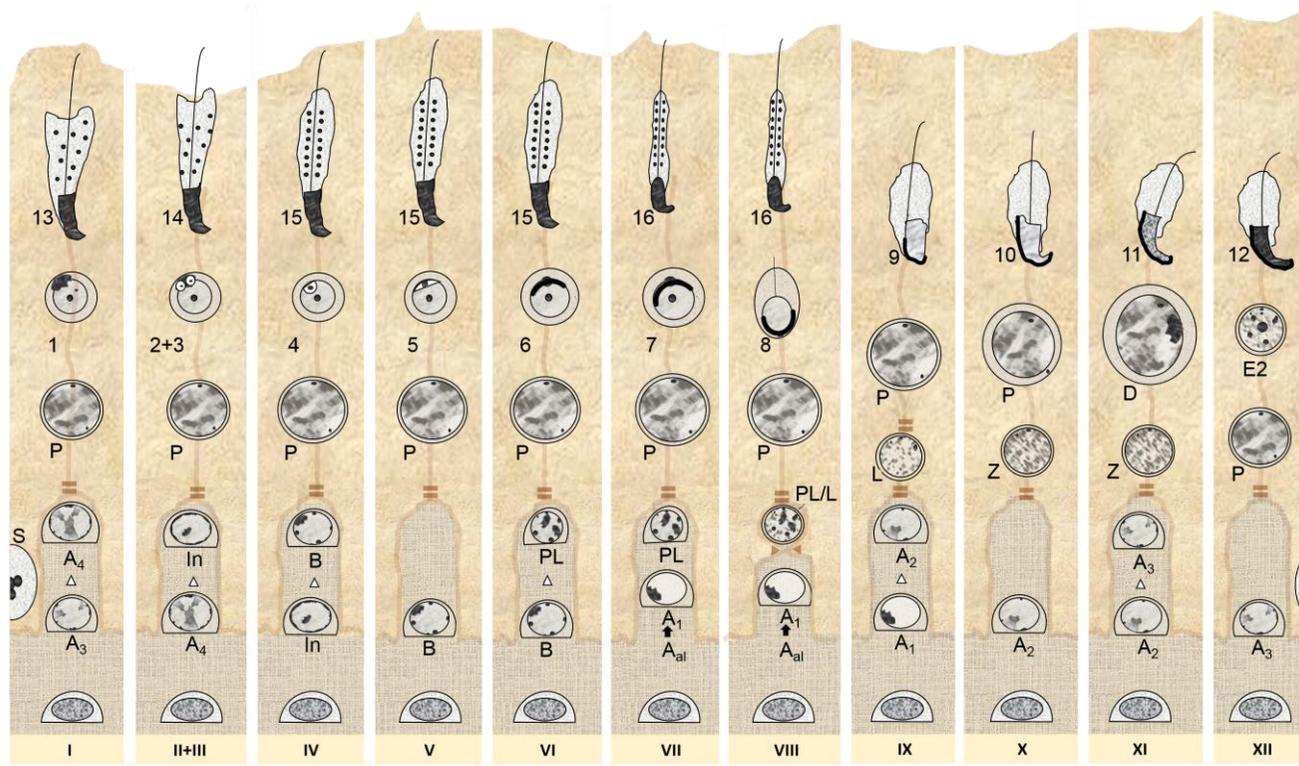


Figura 2. Desenho esquemático das associações entre células germinativas nos 12 estádios acrossômicos do ciclo do epitélio seminífero em camundongos (Baseado em: de Rooij, 1998; Russell *et al.*, 1990). As associações entre as células germinativas estão aqui apresentadas em composições lineares, entre as células de Sertoli (S). As cabeças de seta mostram as mitoses espermatogoniais e a seta reta mostra o processo de diferenciação das espermatogônias $A_{\text{alinhadas}}$ (A_{al}) em A_1 . Nos estádios VIII a X, observa-se a translocação dos espermatócitos primários do ambiente basal para o adluminal. Junções de oclusão (=) entre as células de Sertoli adjacentes delimitam os dois ambientes (Smith e Braun, 2012). As espermatogônias $A_{\text{indiferenciadas}}$ (A_{ind}), A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , Intermediária (In) e B repousam sobre a lâmina basal. As espermatogônias A_{ind} podem ser encontradas em qualquer um dos estádios. Demais células: Espermatócitos primários em preleptóteno (PL), leptóteno (L), zigóteno (Z), paquíteno (P) e diplóteno (D), espermatócitos secundários (E2) e espermátides (1 a 16).

A meiose I se processa em quatro fases, de acordo com os eventos principais de pareamento, alinhamento central, distribuição e separação dos cromossomos homólogos, denominadas, respectivamente: prófase, metáfase, anáfase e telófase. A fase mais longa da meiose I é a prófase. Ela possui quatro etapas, e os espermatócitos em curso de cada uma dessas etapas podem ser distinguidos entre si por microscopia de luz: leptóteno (L), zigóteno (Z), paquíteno (P) e diplóteno (D) (Russell *et al.*, 1990).

Ao longo da prófase os espermatócitos primários aumentam progressivamente de tamanho. Na transição de preleptóteno para leptóteno, os cromossomos começam a se condensar e deixam a cromatina com a aparência de “linhas finas” no núcleo. Durante essa transição, os espermatócitos também perdem o contato com a lâmina basal, assumem um formato mais arredondado e se movem em direção apical no epitélio seminífero (Fig.2). Na etapa de zigóteno, eles iniciam o pareamento dos cromossomos homólogos, que são visualizados como “linhas” de cromatina mais densas no núcleo. Posteriormente, os espermatócitos progridem para a etapa de paquíteno, que é a mais duradoura da prófase I (duração acima de uma semana) (Russell *et al.*, 1990).

No paquíteno, os cromossomos homólogos se tornam completamente pareados e passam por um processo de permuta de sequências de bases de DNA, que aumenta a variabilidade genética dos futuros gametas. Esse processo é conhecido como *crossing-over*. Na microscopia de luz observa-se o aumento significativo do núcleo dos espermatócitos primários na etapa de paquíteno. Conseqüentemente, os cromossomos são observados cada vez mais dispersos no núcleo. Por fim, na etapa de diplóteno, os pares de cromossomos se separam, exceto na região dos quiasmas. Os espermatócitos em diplóteno são semelhantes àqueles em final de paquíteno, porém têm tamanho ainda maior. As demais fases da meiose I (metáfase, anáfase e telófase) se processam na sequência e ocorrem, comparativamente à prófase, em um tempo muito curto (Russell *et al.*, 1990).

Quando os espermatócitos primários estão na transição de preleptóteno para leptóteno, eles sofrem translocação do ambiente basal do epitélio seminífero para o adluminal. A delimitação desses ambientes é feita pelas junções de oclusão entre as células de Sertoli (junções Sertoli-Sertoli), que as possibilitam controlar o *milieu* em que as células germinativas são mantidas no ambiente adluminal. A translocação se inicia com a formação de uma nova junção de oclusão Sertoli-Sertoli abaixo dos espermatócitos que perderam contato com a lâmina basal. Quando essa junção se forma completamente, aprisiona os espermatócitos em leptóteno em um ambiente transitório, chamado de ambiente intermediário (**Fig.2**). Posteriormente, a antiga junção de oclusão Sertoli-Sertoli, que havia acima dos espermatócitos e os mantinha no ambiente basal, se desfaz. Assim, a translocação dos espermatócitos primários para o ambiente adluminal se completa (Smith e Braun, 2012).

Com a finalização da meiose I são gerados os espermatócitos secundários. Estes, por sua vez, passam pela meiose II, e originam as espermátides do passo 1. Os espermatócitos secundários são células efêmeras e por isso são observados com pouca frequência na

microscopia de luz. Eles podem ser diferenciados das espermatídes do passo 1 por apresentarem diâmetro 30 a 70% maior e heterocromatina indistinta (Russell *et al.*, 1990).

A última fase da espermatogênese é a espermiogênese, que se caracteriza pela maturação das espermatídes haploides em espermatozoides. Em camundongos, as espermatídes passam por 16 passos de diferenciação morfológica ao longo da espermiogênese (**Fig.2**). Durante essa fase elas desenvolvem o acrossoma e o flagelo e ocorre a compactação da cromatina no núcleo e a eliminação de porções desnecessárias de citoplasma, denominadas corpos residuais (Russell *et al.*, 1990).

Todos os eventos mencionados da espermatogênese (ciclo do epitélio seminífero) têm duração de aproximadamente 39,15 dias nos camundongos (de Rooij, 1998).

4.2. Pontes intercelulares: histórico e função

A existência de “processos” conectando células testiculares foi descrita por Sertoli, em 1877 e também por Ebner em 1888, dois séculos atrás (Greenbaum *et al.*, 2011). No final da década de 1950, descobriu-se que esses “processos” se tratavam de pontes citoplasmáticas, que interconectavam grupos de células germinativas, em desenvolvimento sincrônico (Revisado por Fawcett, 1961). Aproximadamente três décadas depois, a estrutura básica da ponte intercelular foi descrita: um canal com “parede” interna elétron densa e que se compõe predominantemente de actina (Russell *et al.*, 1987). Contudo, os mecanismos moleculares da formação das pontes em mamíferos só começaram a ser descobertos recentemente (Tópico 4.3).

É conhecido que as pontes intercelulares são fundamentais para a fertilidade de mamíferos machos (Greenbaum *et al.*, 2006). No entanto, sua função nos testículos permanece alvo de especulações (Greenbaum *et al.*, 2011). Acredita-se que as pontes intercelulares possibilitem o compartilhamento de sinais essenciais para o sincronismo das mitoses espermatogoniais (Fawcett *et al.*, 1959; Huckins e Oakberg, 1978; Ren e Russell, 1991) e para a entrada coordenada dos espermátócitos primários em meiose (Stanley *et al.*, 1972; Robinson e Cooley, 1996). Em fêmeas, na fase embrionária e neonatal, também se observam pontes intercelulares entre oogônias e oócitos, e os grupos celulares se diferenciam sincronicamente (Zamboni e Gondos, 1968; Greenbaum *et al.*, 2009).

Outra hipótese seria o compartilhamento de produtos gênicos entre espermatídes haploides, possibilitando-as permanecer fenotipicamente equivalentes. RNA mensageiro (mRNA) e proteínas são distribuídos igualmente entre essas células através das pontes intercelulares (Braun *et al.*, 1989), inclusive mRNA codificados por genes ligados ao sexo (Morales *et al.*, 2002). Organelas também foram observadas em trânsito através das pontes intercelulares de espermatídes (Ventela *et al.*, 2003) e de oogônias e oócitos (Zamboni e Gondos, 1968).

Por fim, trabalhos sugerem que as pontes intercelulares podem atuar no compartilhamento de sinais de apoptose, que possibilitam a morte celular programada da maioria dos oócitos durante o período fetal ou neonatal (Zamboni e Gondos, 1968), a eliminação de clones de células germinativas com mutações prejudiciais (LeGrand, 2001) e a regulação do número de células germinativas nos testículos, através da morte celular programada de espermatogônias dos tipos A₂, A₃ e A₄ (de Rooij, 2001; Harmer *et al.*, 2003).

4.3. Citocinese e formação das pontes intercelulares em células germinativas

A citocinese é o processo de separação física do citoplasma de uma célula parental que finaliza a divisão celular e possibilita a origem de duas células-filhas individualizadas (Mishima, 2016). Esse processo se inicia na anáfase e finaliza na telófase, quando o núcleo das células-filhas está em intérfase. Morfologicamente, começa com o aparecimento do sulco de clivagem na superfície da célula. À medida que o ciclo celular progride da anáfase para a telófase, o sulco de clivagem se aprofunda, até dividir completamente a célula parental em duas células-filhas (Alberts *et al.*, 2002).

Considera-se que a citocinese tem quatro etapas: iniciação, contração, inserção de membrana e conclusão. Na primeira etapa, os microtúbulos orientados por proteínas da matriz do fuso mitótico especificam o local da montagem do anel contrátil no início da anáfase. Posteriormente, na etapa de contração, eles dão estabilidade ao avanço do sulco de clivagem até a telófase (Werner e Glotzer, 2008; Mishima, 2016).

O anel contrátil é estrutura que fornece a força mecânica para o aprofundamento do sulco de clivagem. Ele se forma na superfície interna da célula, e se constitui de arranjos sobrepostos de filamentos de actina e miosina II. Simultaneamente à contração, extensões de membrana são inseridas nas adjacências do anel contrátil por fusão de vesículas intracelulares. Essa inserção é necessária para compensar o aumento da área de superfície que acompanha a divisão do citoplasma. Ao final da telófase a membrana plasmática do sulco de clivagem se estreita para formar o corpo mediano. Essa estrutura persiste como uma fina ligação entre as células-filhas e contém os restos do eixo central, que agora é composto por dois conjuntos de microtúbulos antiparalelos e sobrepostos, empacotados firmemente, no interior de um material de matriz densa. A citocinese é então concluída com a abscisão do corpo mediano (Alberts *et al.*, 2002).

Nas células germinativas, não há abscisão do corpo mediano ao final da telófase. O que ocorre é a conversão do corpo mediano em uma ponte intercelular estável. Essa conversão é mediada por uma proteína da matriz do fuso mitótico, denominada *Testis-Expressed Gene 14* (TEX14) (Greenbaum *et al.*, 2007).

A proteína TEX14 é uma quinase inativa essencial para a formação das pontes intercelulares entre as células germinativas de mamíferos machos (Greenbaum *et al.*, 2006) e fêmeas na fase embrionária (Greenbaum *et al.*, 2009). Basicamente, a sequência da pro-

teína consiste de três repetições anquirina em seu N-terminal, um domínio central semelhante à quinase e um motivo em *zipper* de leucina em seu C-terminal. As unidades repetidoras de anquirina podem estar envolvidas na ancoragem de proteínas reguladoras específicas (Wu *et al.*, 2003). O domínio kinase é inativo (Greenbaum *et al.*, 2011) e o motivo em *zipper* de leucina pode representar um motivo de dimerização (Wu *et al.*, 2003).

A proteína TEX14 é um componente estrutural das pontes intercelulares, que se localiza nessas pontes, com outras proteínas conhecidamente envolvidas na citocinese de células somáticas: a *Mitotic Kinesin-Like Protein 1* (MKLP1), a *Male Germ Cell Rac GTPase-activating protein* (MgcRacGAP) (Greenbaum *et al.*, 2007) e a *Centrosomal Protein 55-KDa* (CEP55) (Iwamori *et al.*, 2010).

As proteínas MKLP1 e a MgcRacGAP formam um complexo conhecido como *centralspindlin*, que se localiza no fuso mitótico, mais especificamente na matriz dos microtúbulos centrais. Esse complexo recruta proteínas que atuam na especificação do plano de clivagem (Mishima *et al.*, 2016). No corpo mediano, que é a comunicação citoplasmática transiente que resta entre as células-filhas ao final da telófase (Alberts *et al.*, 2002), o complexo *centralspindlin* atua no recrutamento de proteínas efetoras da abscisão, dentre elas a CEP55 (Mishima *et al.*, 2016).

Iwamori *et al.* (2010) mostrou que proteína TEX14 interage fortemente com a CEP55 através da região N-terminal, onde estão presentes vários domínios espiralados. Devido à forte interação, os autores sugerem que a expressão preferencial da proteína TEX14 nas células germinativas bloqueia a CEP55, por ligação competitiva. Dessa forma, a CEP55 fica impossibilitada de executar seu papel no corpo mediano. Em células somáticas, esse bloqueio impossibilita a abscisão do corpo mediano, e em consequência são geradas células multinucleadas (Iwamori *et al.*, 2010).

Ao longo da espermatogênese ocorre aumento do diâmetro das pontes intercelulares, sugerindo que fatores extras são adicionados (Greenbaum *et al.*, 2011). Um deles é a *RNA Binding Motif Protein 44* (RBM44), que compõe a ponte intercelular de espermátocitos primários na fase de paquíteno e de espermátocitos secundários. Especula-se que a RBM44 possa mediar o transporte de RNA entre as células-filhas, através das pontes intercelulares. Contudo, essa proteína não é essencial para a estabilidade das pontes intercelulares ou para a fertilidade (Iwamori *et al.*, 2011).

4.4. Consequências da ausência das pontes intercelulares na espermatogênese de camundongos TEX-14

Camundongos heterozigotos para Tex14 (genótipo *Tex14^{+/-}*) mantém pontes citoplasmáticas entre as células germinativas e espermatogênese normal, como os selvagens. De modo contrário, camundongos *knockout Tex14* (genótipo *Tex14^{-/-}*) são geneticamente incapazes de produzir a proteína TEX14 e, conseqüentemente, não apresentam pontes

citoplasmáticas entre as células germinativas. Nestes camundongos, a espermatogênese é interrompida na fase meiótica (Greenbaum *et al.*, 2006).

Contudo, a fase proliferativa da espermatogênese (**Fig.1**) parece não ser influenciada pela ausência de pontes intercelulares. Greenbaum *et al.* (2006) verificaram que em camundongos *Tex14^{-/-}* de 10 e 14 dias de idade, não há diferença no número de espermatogônias marcadas pelo 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), que é um marcador da fase-S do ciclo celular. Aos 21 dias de idade, não há alteração no número de células marcadas pela proteína *Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger* (PLZF), que é um marcador de espermatogônias indiferenciadas, e não há diferença na expressão de mRNA de KIT (*Tyrosine Kinase Receptor*) nos testículos, que é um marcador de espermatogônias diferenciadas (Greenbaum *et al.*, 2006).

Já às oito semanas de idade, observa-se nos testículos de camundongos *Tex14^{-/-}* maior expressão de mRNA de marcadores de espermatogônias indiferenciadas, como mRNA de PLZF (Iwamori *et al.*, 2012), e de espermatogônias diferenciadas, como mRNA de KIT (Greenbaum *et al.*, 2006; Iwamori *et al.*, 2012). É proposto que tal aumento da expressão de KIT às oito semanas de idade seja decorrente de enriquecimento relativo de espermatogônias frente à perda de espermátócitos e à ausência de espermátides (Greenbaum *et al.* 2006).

Entretanto, a análise de marcadores não se acompanhou de um estudo morfológico detalhado das espermatogônias no epitélio seminífero de camundongos *Tex14^{-/-}*. Esse estudo pode ajudar a esclarecer como tais células se comportam na ausência de pontes intercelulares, constituindo-se o objetivo geral da presente tese.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados um total de sete camundongos adultos da linhagem S129/C57 com 84 dias de idade para estudos morfológicos e morfométricos sob HRLM e seis camundongos com 56 dias de idade para estudos da proliferação espermatogonial com BrdU. Os procedimentos utilizados nestes estudos foram aprovados pelo *M.D. Anderson Cancer Center Institutional Animal Care and Use Committee*, conforme regulamenta a *American Association for the Accreditation on Laboratory Animals Care*.

Para os estudos sob HRLM, três camundongos foram heterozigotos (*Tex14^{+/-}*) e quatro foram homozigotos ou *knockout* (*Tex14^{-/-}*) enquanto para avaliação da proliferação espermatogonial, dois foram *Tex14^{+/-}* e quatro foram *Tex14^{-/-}*.

Estes animais foram preparados pelo Prof. Dr. Martin Matzuk, da Baylor College of Medicine da University of Texas (Houston) e cedidos para o Department of Experimental Radiation Oncology do MD Anderson Cancer Center, também da University of Te-

xas (Houston), coordenado pelo Prof. Dr. Marvin L. Meistrich. Neste laboratório os testículos destes animais foram fixados conforme objetivos específicos (como descrito abaixo) e os fragmentos encaminhados para o Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do ICB/UFMG, onde foram processados e analisados.

5.2. *Processamento Histológico para HRLM e Microscopia Eletrônica de Transmissão*

Os camundongos foram submetidos ao processo de fixação testicular por perfusão intracardíaca. Para isso, foram primeiramente tratados com injeção intraperitoneal de 125UI/kg de heparina (Liquemine, Roche) e anestesiados quinze minutos depois com injeção intraperitoneal de 30mg/kg de tiopental (Thiopentax, Cristalia). Em seguida, tiveram seu leito vascular perfundido com solução salina e depois com solução fixadora de glutaraldeído 5% em tampão cacodilato 0,05M (pH 7,4), conforme descrito por Chiarini-Garcia e Meistrich (2008). Posteriormente, os testículos foram removidos, cortados em fragmentos de aproximadamente 1 mm de espessura e armazenados em tampão cacodilato 0,05M (pH 7,4) a 4°C até a inclusão. Nessa etapa, os testículos foram pós-fixados em uma mistura de 1% de tetróxido de ósmio (p/v) e 1,25% de ferrocianeto de potássio (p/v), desidratados em gradientes de concentração crescente de etanol e infiltrados e embebidos em resina Araldite 502. Secções de 1µm de espessura foram obtidas e coradas com corante azul de toluidina-borato de sódio para avaliação do tecido sob HRLM. Desses blocos também foram obtidas secções ultrafinas para avaliação do tecido sob microscopia eletrônica de transmissão.

5.3. *Marcação pelo BrdU*

Marcação com BrdU foi usada em adição à HRLM para estudar a proliferação das espermatogônias (Shuttlesworth *et al.*, 2000). Os camundongos *Tex14^{+/-}* e *Tex14^{-/-}* receberam injeção intraperitoneal de BrdU (60 mg/kg de peso corporal; Sigma, B5002). Uma hora depois, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 30 mg/kg de tiopental (Thiopentax, Cristalia) e tiveram seus testículos removidos e fixados por imersão em etanol 70%. Posteriormente, os testículos foram cortados em pequenos fragmentos e embebidos em resina glicol metacrilato (Historesin, Leica) (Chiarini-Garcia *et al.*, 2011). Desses blocos foram obtidas secções de 5 µm de espessura para montagem das lâminas. Elas foram coradas por imersão em H₂O₂ 0,6% por 5 min, e lavadas em água destilada por mais 5min. Posteriormente, as lâminas foram tratadas com protease 0,1% por 1h, lavadas com tampão salina e expostas ao 2N HCl por 50 min, para recuperação do antígeno. A reação foi então neutralizada pela imersão das lâminas em borato de sódio 0,1M por 2min. Na sequência, as lâminas foram bloqueadas com 10% de soro de cavalo em tampão fosfato salino contendo 0,02% de triton-X100 (PBS_T) por 30min, a 37° C. Depois elas foram incubadas com o anticorpo primário (B44, IgG₁ purificada anti-BrdU, BD Biosciences, 347580) por 1h, a 37° C; o controle negativo recebeu apenas soro de cavalo. As lâminas foram lavadas em PBS_T duas vezes, por 5 min, e incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-camundongo (Vector Laboratories,

PK6102; diluição 1:1000) por 30 min, a 37°C. Posteriormente, foram tratadas com o kit ABC, de acordo com as recomendações do fabricante. Finalmente, as lâminas foram tratadas com diaminobenzidina (DAB-kit, Vector Laboratories, SK4100), contracoradas com hematoxilina por 1 min e lavadas em água de torneira por 5 min. Imagens foram obtidas com o fotomicroscópio BX-51 e com a câmera digital Q-Color 3 (Olympus, Tokyo, Japan) para análise.

5.4. Avaliação do tecido sob HRLM

No estudo das lâminas sob HRLM foi feita a contagem das espermatogônias (A_{ind} , A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , I_n e B) (Chiarini-Garcia e Russell, 2001) e dos espermatócitos primários nas diferentes fases da prófase I (PL, L, Z, P e D) (Russell *et al.*, 1990). As contagens foram ajustadas por 100 nucléolos de células de Sertoli¹, e pela correção de Abercrombie (Abercrombie, 1946). Elas foram feitas em no mínimo 60 secções transversais e ligeiramente oblíquas de túbulos seminíferos por animal, analisadas aleatoriamente. O sistema espermatogonial (Huckins, 1978) foi adotado para a classificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero (**Tab.1**), em vez do clássico sistema acrossômico (Russell *et al.*, 1990), devido à ausência de espermátides em camundongos mutantes *Tex14^{-/-}*. Também foram feitas as contagens de mitoses espermatogoniais² e de apoptoses de espermatogônias e espermatócitos primários em preleptóteno³, uma vez que tais eventos influenciam a cinética das células germinativas. Os números obtidos foram ajustados por 100 espermatogônias totais, para estabelecimento dos índices mitótico e apoptótico.

5.5. Avaliação do tecido marcado pelo BrdU

No estudo das lâminas marcadas pelo BrdU foi feita a contagem das espermatogônias marcadas (BrdU-positivas) e não marcadas (BrdU-negativas) em 40 secções transversais de túbulos seminíferos. Posteriormente, foi determinada a porcentagem de espermatogônias BrdU-positivas em cada secção transversal de túbulo seminífero, para sua distribuição em até oito intervalos de classes ($I^1 < 13\%$, $13\% \geq I^2 < 25\%$, $25\% \geq I^3 < 38\%$, $38\% \geq I^4 < 50\%$, $50\% \geq I^5 < 63\%$, $63\% \geq I^6 < 75\%$, $75\% \geq I^7 < 88\%$, $I^8 \geq 88\%$). Essa análise teve o intuito de verificar possível mudança no padrão de proliferação das espermatogônias em camundongos *knockout Tex14*, por consequência da ausência de pontes intercelulares.

¹ Em camundongos adultos, as células de Sertoli não se proliferam, estando presentes em número estável no epitélio seminífero (Vergouwen *et al.*, 1991).

² As espermatogônias em mitose geralmente aparecem na HRLM como células com cromatina condensada e localização próxima da membrana basal dos túbulos seminíferos.

³ As apoptoses de espermatogônias e de espermatócitos em preleptóteno normalmente aparecem na HRLM como células com cromatina finamente granular em processo de escurecimento e fragmentação e localização adjacente à membrana basal dos túbulos seminíferos.

Tabela 1. Classificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero com base no sistema espermatogonial e comparação com o sistema-padrão acrossômico.

Estádios espermatogoniais	Definição de Huckins (1978)	Adaptação	Comparação no sistema acrossômico
1	Presença de espermatogônia A ₁	A espermatogônia A ₁ é o principal tipo de espermatogônia diferenciada no epitélio seminífero.	Final VII - Meio IX
2	Presença de espermatogônia A ₂	A espermatogônia A ₂ é o principal tipo de espermatogônia diferenciada no epitélio seminífero.	Final IX - Meio XI
3	Presença de espermatogônia A ₃	A espermatogônia A ₃ é o principal tipo de espermatogônia diferenciada no epitélio seminífero.	Final XI - Meio I
4	Presença de espermatogônia A ₄	A espermatogônia A ₄ é o principal tipo de espermatogônia diferenciada no epitélio seminífero.	Final I - Meio II+III
5	Presença de espermatogônia In	A espermatogônia In é o principal tipo de espermatogônia diferenciada no epitélio seminífero.	Final II+III -Meio V
6	Presença de espermatogônia B	A espermatogônia B é o principal tipo de espermatogônia diferenciada no epitélio seminífero.	Final V - Meio VII

Nota: Em caso de números iguais de dois ou mais tipos de espermatogônias ou de presença de espermatogônias de ciclos diferentes no mesmo corte transversal, considerou-se, respectivamente, a espermatogônia mais avançada no processo e a do ciclo mais recente para a classificação do estágio.

5.6. Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As variáveis foram avaliadas por estatística descritiva. Posteriormente, elas foram submetidas aos testes t de Student para amostras independentes (na comparação de duas médias) ou à análise de variância e teste de Tukey. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e o nível de significância foi de 5%.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Morfologia das células germinativas

A microscopia de luz de alta resolução (*High Resolution Light Microscopy* - HRLM) mostrou que a associação dos processos de fixação e de inclusão utilizados na técnica preservou adequadamente as estruturas do epitélio seminífero e possibilitou a observação acurada dos detalhes morfológicos dos diferentes tipos de células germinativas.

A ausência de pontes intercelulares estáveis nos camundongos *Tex14^{-/-}* não afetou significativamente a morfologia do núcleo das espermatogônias na HRLM, e possibilitou classificá-las em A_{ind} , A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In e B (**Fig. 3**), conforme preconizado por Chiari-Garcia e Russell (2001). A única alteração morfológica evidente em espermatogônias, também observada em células germinativas mais avançadas, foi a exibição de binucleação (**Fig. 4A-C**), mas as ocorrências foram raras.

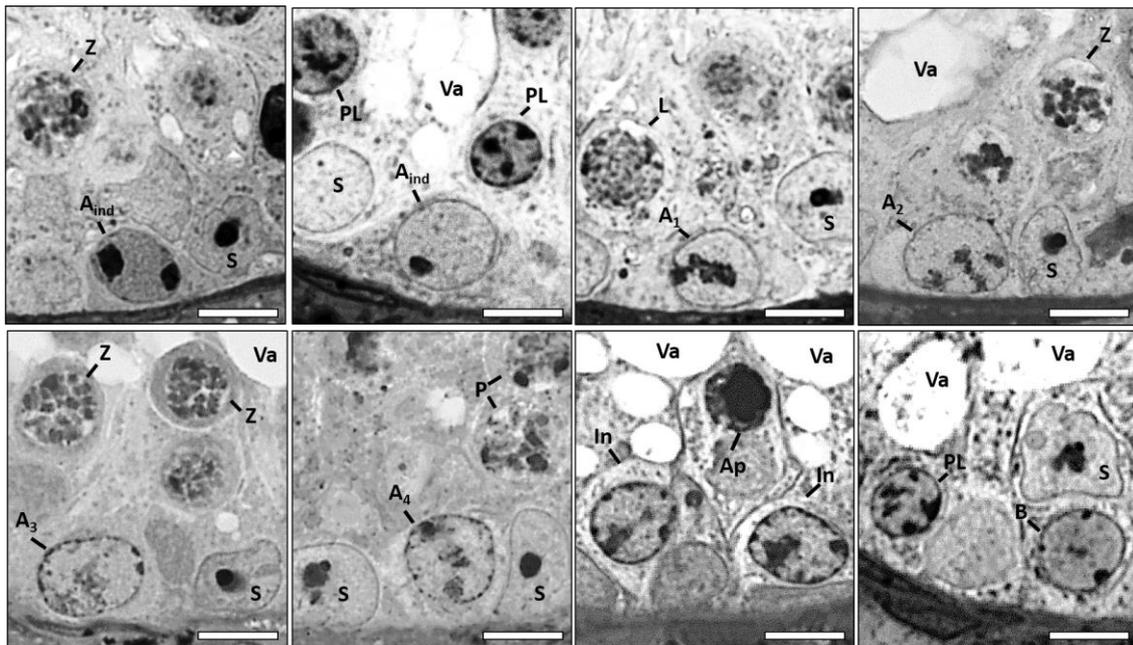


Figura 3. Morfologia das espermatogônias nos testículos de camundongos *knockout Tex14*. A morfologia das espermatogônias $A_{indiferenciadas}$, A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , Intermediária e B se manteve em normalidade, apesar da ausência de pontes intercelulares. A_{ind} = espermatogônia $A_{indiferenciada}$; In = espermatogônia intermediária; Espermatócitos primários em preleptóteno (PL), leptóteno (L), zigóteno (Z) e paquíteno (P); S = célula de Sertoli; Va = Vacúolo; Ap = célula germinativa em apoptose. Técnica: Microscopia de Luz de Alta Resolução. Barra = 8 μ m.

Outra ocorrência morfológica eventual foi a presença de pares de espermatogônias e de espermatócitos primários em preleptóteno unidos por uma estreita conexão citoplasmática, no epitélio seminífero de camundongos *Tex14^{-/-}* (**Fig. 4D-F**).

Segundo Alberts *et al.* (2002), no final da telófase de células somáticas, o núcleo das futuras células-filhas retorna à interfase e elas permanecem transitoriamente unidas por uma estreita conexão citoplasmática, denominada corpo mediano, até que sua abscisão efetivamente conclui a citocinese. Greenbaum *et al.* (2007) mostraram que o corpo mediano se forma normalmente durante a citocinese de células germinativas nos camundongos *Tex14^{-/-}*. Contudo, o mesmo não é convertido em pontes intercelulares estáveis devido à ausência da proteína TEX14. Neste caso, a abscisão do corpo mediano se processa como ocorre em células somáticas (Greenbaum *et al.*, 2006, 2007) ou o corpo mediano eventualmente se desfaz sem que ocorra abscisão, levando a formação de células binucleadas, como demonstrado no presente trabalho.

É possível que as conexões citoplasmáticas encontradas na HRLM sejam simplesmente o corpo mediano de células germinativas em processo final de telófase. Tais conexões não são pontes intercelulares estáveis, pois estudos pormenorizados de imunistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão não encontraram indícios de sua presença nos camundongos *knockout Tex14* (Greenbaum *et al.*, 2006).

Alteração significativa de morfologia foi encontrada nos espermatócitos primários de camundongos *Tex14^{-/-}*. Na etapa de preleptóteno, espermatócitos com escurecimento de núcleo e citoplasma indicativo de apoptose foram frequentemente observados no epitélio seminífero (**Fig. 4F**). Na etapa de paquíteno, $19 \pm 10\%$ das células exibiram alterações morfológicas, sendo que $40 \pm 24\%$ delas apresentaram núcleo claro, evidenciando condensação anormal dos cromossomos (**Fig. 5B**) e as demais apresentaram alterações típicas de apoptose, como aglutinação e fragmentação de cromatina e de organelas, bem como fragmentação de membranas (**Fig. 5C**).

Os espermatócitos primários em paquíteno foram progressivamente eliminados do epitélio seminífero por apoptose (detalhes no Tópico 6.3), levando à interrupção da espermatogênese no início da fase meiótica. A morfologia dessas células se apresentou aparentemente normal nos estádios espermatogoniais 3 e 4, mas nos estádios 5 e 6, a maioria dos espermatócitos em paquíteno começou a exibir alterações nucleares indicativas de morte celular. Apoptoses em fases avançadas foram observadas nos estádios 1 e 2 (**Fig. 5**). Muitos vacúolos foram visualizados no epitélio seminífero em decorrência da depleção das células germinativas e da rápida reabsorção de seus debris pelas células de Sertoli (**Figs. 3-5**).

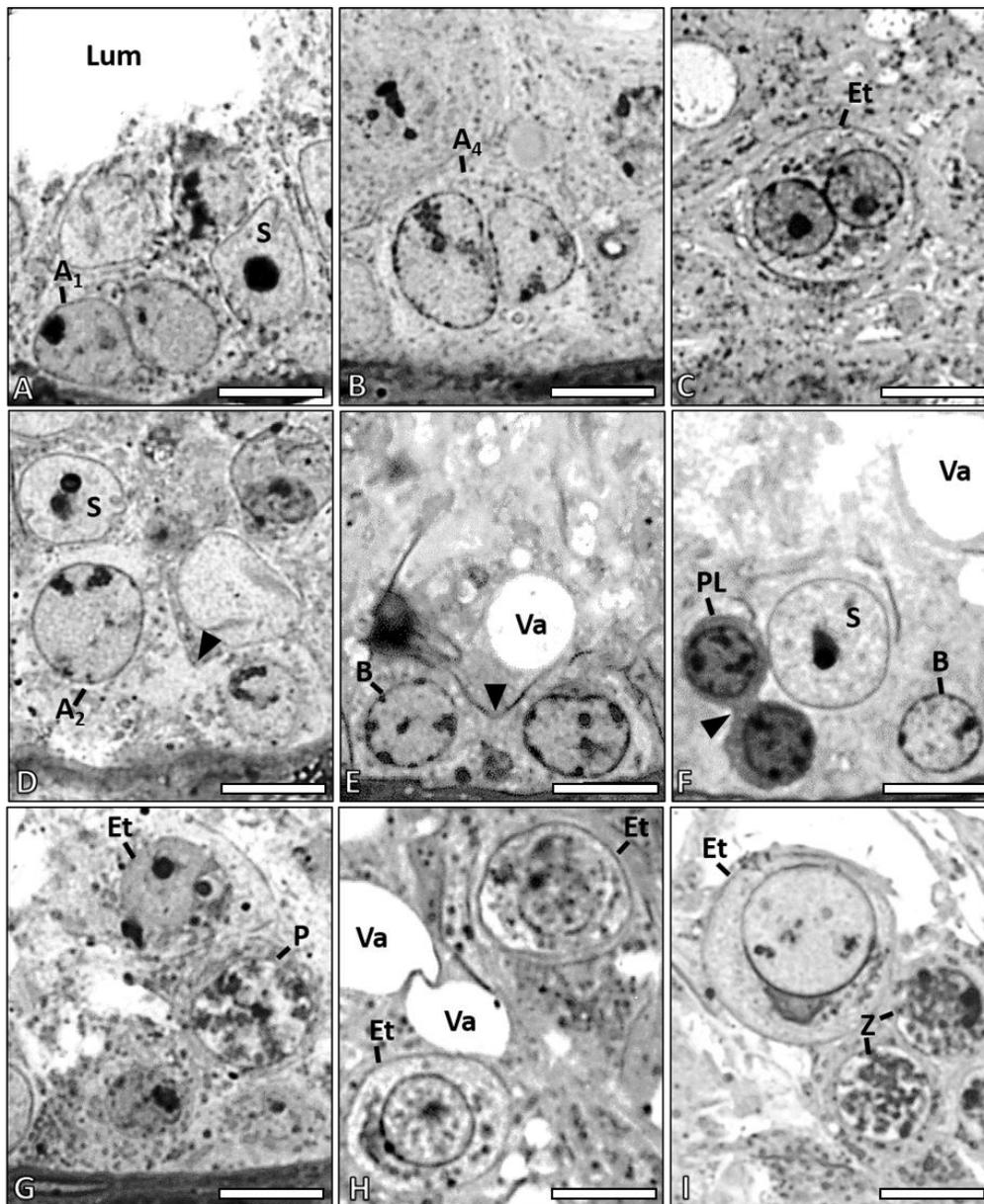


Figura 4. Morfologia e alterações de células germinativas em camundongos *knockout Tex14*. (A-C) Espermátogônias e espermatíde binucleadas. (D-E) Conexões citoplasmáticas evidenciadas pelas cabeças de seta, entre espermátogônias A₂ e B e entre espermátócitos primários em preleptóteno com núcleo e citoplasma escurecido, aparentemente em processo de morte celular. (G-H) Espermátides redondas aparentemente normais e (C, I) com alterações morfológicas (binucleação e hipertrofia, respectivamente). S = célula de Sertoli; Va = vacúolo; espermátócitos primários em preleptóteno (PL), zigóteno (Z) e paquíteno (P); Lum = lúmen; Et = espermatíde. Técnica: Microscopia de Luz de Alta Resolução. Barras = 10µm.

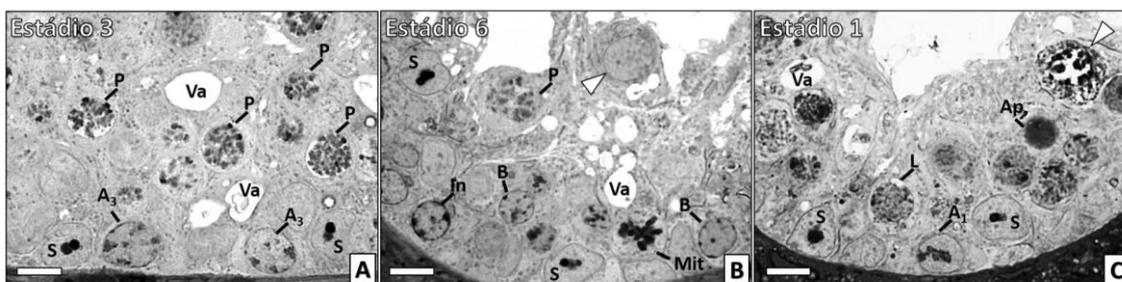


Figura 5. Epitélio seminífero de camundongos *Tex14^{-/-}* nos estádios espermatogoniais 3, 6 e 1, onde são evidenciadas a morfologia e a depleção dos espermatócitos primários em paquíteno. (A) no estágio 3, os espermatócitos primários em paquíteno apresentam morfologia normal; (B) no estágio 6, apenas um espermatócito em paquíteno com morfologia normal e muitos vacúolos são observados, devido à pronunciada depleção dessas células nos estádios anteriores. Um paquíteno alterado, no qual os cromossomos não aparecem com condensação normal, também pode ser observado próximo ao lúmen do túbulo seminífero (cabeça de seta); (C) no estágio 1, nenhum espermatócito em paquíteno com morfologia normal é observado, somente um em apoptose avançada (cabeça de seta). In = espermatogônia indiferenciada; Espermatócitos em leptóteno (L) e paquíteno (P); S = célula de Sertoli; Va = vacúolo; Mit = figura de mitose. Técnica: Microscopia de Luz de Alta Resolução. Barra = 10µm.

Em uma revisão, de Rooij e Boer (2003) mostraram que camundongos mutantes ou geneticamente modificados, com problemas de pareamento de cromossomos ou deficiências nos mecanismos de recombinação e reparo de DNA, apresentam aumento de apoptose ou completa depleção de espermatócitos primários no estágio IV do ciclo do epitélio seminífero. Segundo esses autores, nesse ponto ocorre a checagem da qualidade (*check point*) dos espermatócitos primários em paquíteno e a indução de apoptose em células aberrantes. O estágio IV equivale ao estágio espermatogonial 5, onde ocorre a proliferação das espermatogônias In em B. O estágio 5 é justamente o momento a partir do qual o número de espermatócitos primários em paquíteno derradeiramente diminui ($p < 0,05$) nos camundongos *Tex14^{-/-}* (detalhes no Tópico 6.3, **Fig. 11**).

Em células somáticas, Mondal *et al.* (2012) mostraram que a proteína TEX14 não está relacionada somente com a função do corpo mediano. Ela também é recrutada para os cinetócoros no início da mitose, e sua deficiência resulta em bloqueio da ligação bipolar entre os cinetócoros e os microtúbulos do fuso mitótico, levando à instabilidade cromossômica e a defeitos de congressão cromossômica. No epitélio seminífero de camundongos normais, a expressão de RNA mensageiro (mRNA) da proteína TEX14 foi maior nos espermatócitos primários em paquíteno que nas demais células germinativas (Wu *et al.*, 2003). Entretanto não é conhecido se a deficiência desta proteína também leva à instabilidade cromossômica durante a meiose.

Eventualmente, um número insignificante de espermatócitos conseguiu concluir as meioses I e II, sendo possível observar raras espermátides arredondadas no epitélio seminífero, algumas aparentemente normais (**Fig. 4G-H**) e outras com alterações morfológicas evidentes, como binucleação (**Fig. 4C**) e hipertrofia (**Fig. 4I**).

Portanto, as pontes intercelulares são dispensáveis à integridade e à sobrevivência das espermatogônias, mas sua ausência nos camundongos *Tex14^{-/-}* se associou com perda de espermatócitos primários e infertilidade.

6.2. Localização das células germinativas

Nos camundongos *Tex14^{+/-}*, as espermatogônias foram observadas em localização usual, em contato com a lâmina basal dos túbulos seminíferos (**Fig. 6A**). Contudo, nos camundongos *Tex14^{-/-}*, algumas espermatogônias do tipo B e figuras de mitose estavam atipicamente posicionadas no epitélio seminífero, afastadas da lâmina basal (**Fig. 6B-C**). Alguns espermatócitos primários em preleptóteno também foram observados afastados da lâmina basal, próximos ao lúmen do epitélio seminífero (**Fig. 6D**). Adicionalmente, a avaliação do epitélio seminífero de camundongos *Tex14^{-/-}* por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelou a presença de espermatócitos primários em preleptóteno no ambiente intermediário (**Fig. 7**).

A marcação pelo BrdU evidenciou claramente a perda da proximidade entre células germinativas BrdU-positivas e a lâmina basal, em algumas seções transversais de túbulos seminíferos de camundongos *Tex14^{-/-}* (**Fig. 8**). No epitélio seminífero, o BrdU é incorporado ao núcleo das espermatogônias e dos espermatócitos primários em preleptóteno durante a fase-S do ciclo celular. O tempo de apenas uma hora, entre a administração de BrdU e a eutanásia dos animais, garantiu que as células marcadas, essencialmente, fossem espermatogônias e espermatócitos em preleptóteno, que passaram pela fase-S do ciclo celular, na última hora de vida.

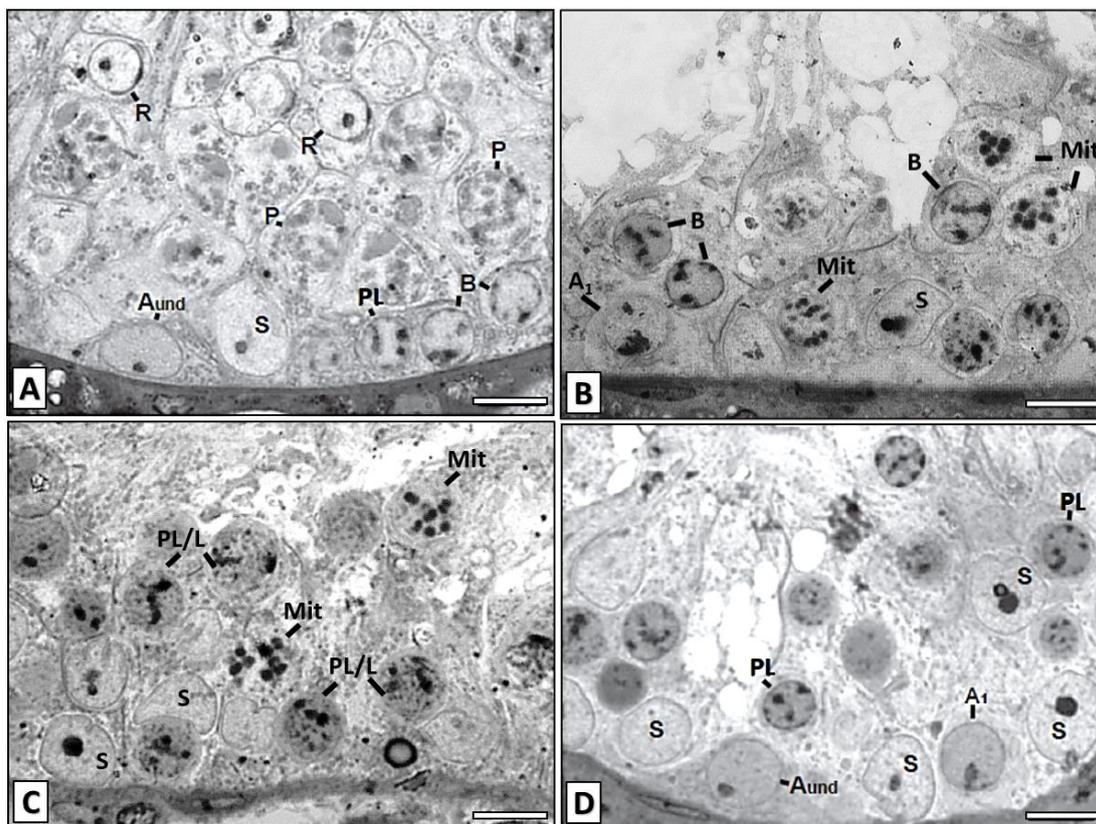


Figura 6. Localização de espermatogônias e de espermatócitos primários no epitélio seminífero de camundongos *Tex14^{+/-}* (A) e *Tex14^{-/-}* (B-D). (A) Espermatogônias *A_{indiferenciadas}* e diferenciadas, e espermatócitos primários em preleptóteno, localizados em posição usual, próximos à lâmina basal. (B-D) Espermatogônias B, figuras de mitose (Mit), e espermatócitos primários em preleptóteno observados em posicionamento atípico, afastados da lâmina basal. *A_{ind}* = espermatogônia *A_{indiferenciada}*; Espermatócitos primários em preleptóteno (PL), na transição de preleptóteno para leptóteno (PL/L) e em paquíteno (P). *R₇* = espermátide redonda do passo 7. S = célula de Sertoli. Técnica: Microscopia de Luz de Alta Resolução. Barra = 10µm.

Segundo Russell *et al.* (1990), as células de Sertoli iniciam a translocação dos espermatócitos primários do compartimento basal para o adluminal quando os mesmos estão na transição preleptóteno/leptóteno. Mas a formação do compartimento intermediário somente se completa quando os espermatócitos estão na fase de leptóteno, no estágio IX do ciclo do epitélio seminífero (Smith e Braun, 2012).

Assim, tanto a perda da proximidade entre espermatogônias B e lâmina basal, como a presença de espermatócitos em preleptóteno no compartimento intermediário são eventos aparentemente precoces nos camundongos *Tex14^{-/-}*. No entanto, é possível que esses eventos ocorram no estágio esperado, envolvendo células germinativas assincronicamente posicionadas (em situação de atraso ao longo dos estádios espermatogoniais - detalhes no Tópico 6.3). Outros estudos são necessários para elucidar essa questão.

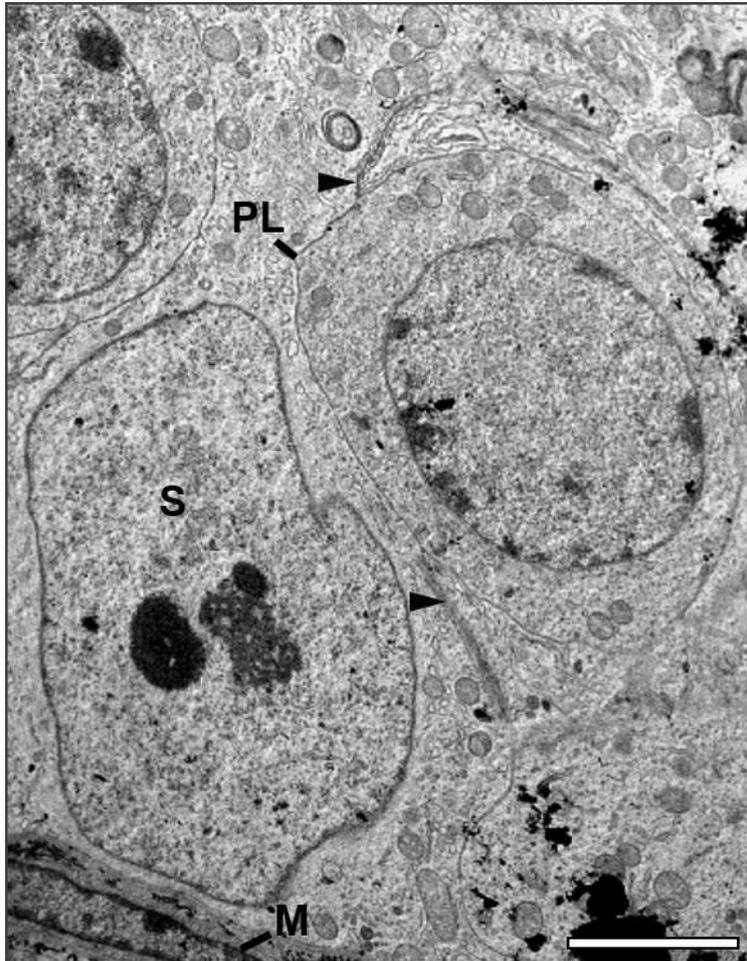


Figura 7. Espermatócito primário em preleptótenu (PL) no ambiente intermediário do epitélio seminífero de camundongos *knockout Tex14*. As cabeças de seta mostram as junções de oclusão Sertoli-Sertoli abaixo e acima do PL, contendo-o no compartimento intermediário. Célula de Sertoli (S) e célula mióide (M). Técnica: Microscopia Eletrônica de Transmissão. Barra = 4 μ m.

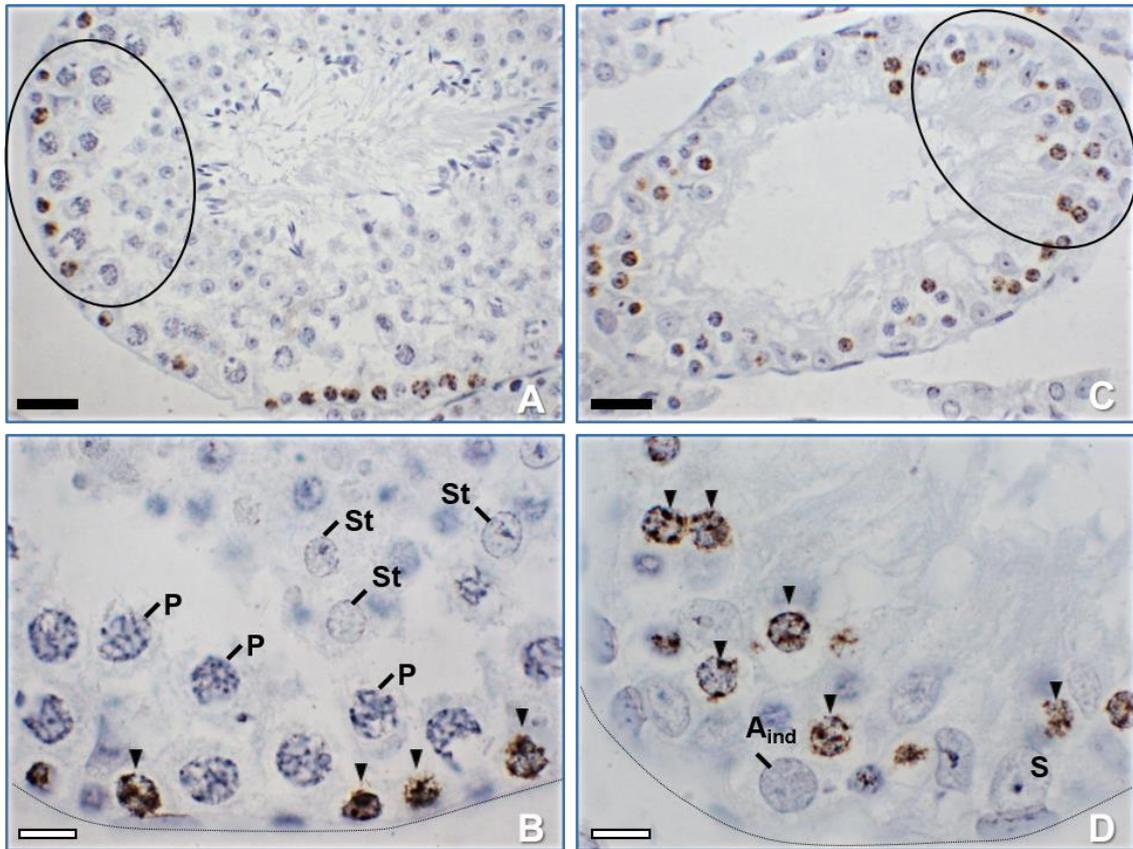


Figura 8. Marcação de espermatogônias pelo BrdU no epitélio seminífero de camundongos *Tex14*^{+/+} (A e B) e *Tex14*^{-/-} (C e D). As figuras B e D são maiores aumentos das áreas circuladas nas figuras A e C, respectivamente. (A-B) Células germinativas BrdU-positivas localizadas em posição usual (cabeça de seta - B), em proximidade à lâmina basal (linha tracejada). (C-D) células germinativas BrdU-positivas localizadas em posicionamento atípico (cabeça de seta - D), afastadas da lâmina basal (linha tracejada). A_{ind} = espermatogônia A_{indiferenciada}; P = espermatócito primário em paquíteno; St = espermátide. S = célula de Sertoli. Técnica: Microscopia de Luz e imunomarcção com BrdU. Barras em preto = 38μm. Barras em branco = 10μm.

6.3. Número e cinética das células germinativas

Os números de espermatogônias A_{ind}/100 nucléolos de células de Sertoli foram estatisticamente semelhantes entre os testículos de camundongos *Tex14*^{+/+} e *Tex14*^{-/-} ($9,9 \pm 3,8$ e $8,6 \pm 3,6$, respectivamente).

Especificamente em cada estágio espermatogonial, os números de espermatogônias A_{ind} também foram estatisticamente semelhantes entre os camundongos *Tex14*^{+/+} e *Tex14*^{-/-}, exceto no estágio 6, onde esse número foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos camundongos *Tex14*^{-/-} (**Fig. 9A**).

Nos camundongos *Tex14*^{+/-}, com espermatogênese semelhante aos selvagens, ocorreu aumento esperado do número de espermatogônias *A*_{ind} dos estádios 2 a 6, seguido por diminuição no estágio 1 ($p < 0,05$) (**Fig. 9A**). Esse comportamento é normal e se deve, respectivamente, à proliferação das espermatogônias *A*_{al} e à sua diferenciação em *A*₁ (de Rooij, 2001). Contudo, as espermatogônias *A*_{ind} não se comportaram da mesma maneira nos camundongos *Tex14*^{-/-}. Nesses camundongos, o número de espermatogônias *A*_{ind} não se alterou ao longo dos estádios espermatogoniais ($p > 0,05$) (**Fig. 9A**).

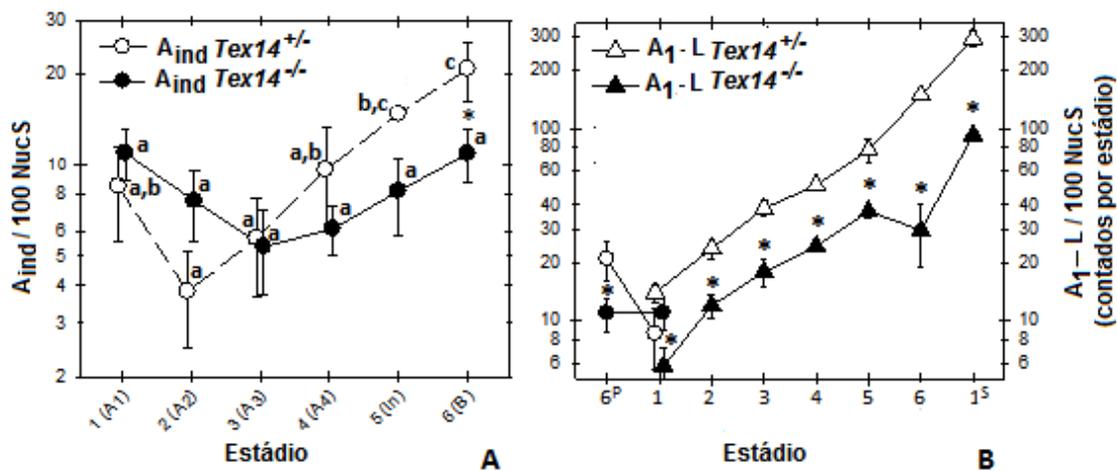


Figura 9. Cinética das espermatogônias em camundongos *Tex14*^{+/-} e *Tex14*^{-/-} ao longo dos estádios espermatogoniais. Em (A) são apresentados os números de espermatogônias *A*_{ind}diferenciadas/100 nucléolos de célula de Sertoli (*A*_{ind}/100 NucS). Em (B) a cinética se inicia com os números de *A*_{ind}/100 NucS nos estádios 6^P (P = ciclo precedente) e 1. Depois são apresentados os números de espermatogônias diferenciadas geradas ao longo dos estádios, acrescidos dos números de espermatócitos primários em preleptóteno e leptóteno/100 NucS (*A*_{1-L}/100 NucS) gerados nos estádios 6 e 1^S (S = ciclo subsequente). Em cada genótipo, letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os estádios ($p < 0,05$). Os asteriscos indicam diferença estatística significativa entre os genótipos ($p < 0,05$). Os gráficos estão apresentados em escala logarítmica (base 10).

Em contrapartida, os números de espermatogônias diferenciadas/100 nucléolos de células de Sertoli foram significativamente menores nos testículos de camundongos *Tex14*^{-/-}, em comparação aos testículos de camundongos *Tex14*^{+/-} (58 ± 6 e 22 ± 3 , respectivamente; $p = 0,0001$).

Especificamente em cada estágio espermatogonial, os números de espermatogônias diferenciadas também foram significativamente menores nos camundongos *Tex14*^{-/-}, em comparação aos camundongos *Tex14*^{+/-} ($p < 0,05$) (**Fig. 9B**).

Nos camundongos *Tex14*^{-/-}, o número de espermatogônias diferenciadas geradas no estágio 1 correspondeu a 42% do encontrado nos camundongos *Tex14*^{+/-}. Esse percentual foi discretamente diferente se comparado ao percentual de espermatogônias *A*_{ind} presen-

tes no estágio 6^P (P = ciclo precedente), que nos camundongos *Tex14^{-/-}* correspondeu a 52% do encontrado nos camundongos *Tex14^{+/-}* (**Fig. 9B**). Os resultados mostram que a diferenciação das espermatogônias A_{ind} em A₁ ocorre normalmente no estágio 1, em ambos os genótipos. Contudo, nos camundongos *Tex14^{-/-}*, um menor estoque de espermatogônias A_{ind} está disponível para esse processo no estágio relacionado.

A subsequente proliferação das espermatogônias A₂ até In ocorreu normalmente nos camundongos *Tex14^{-/-}*, uma vez que o percentual dessas células nos estádios 2 a 5 permaneceu entre 47 e 51% do encontrado nos camundongos *Tex14^{+/-}*. Contudo, no genótipo homocigoto, houve comprometimento da proliferação das espermatogônias diferenciadas no estágio 6, onde o percentual total de células reduziu para apenas 20% do encontrado nos camundongos heterocigotos (**Fig. 9B**). Tal redução se justifica pela perda do sincronismo na proliferação das espermatogônias do tipo B. Nos camundongos *Tex14^{-/-}*, uma fração de 0,60 do total de espermatogônias B estava presente no estágio 6, número significativamente menor ($p < 0,001$) se comparado à fração de 0,94 encontrada nos camundongos *Tex14^{+/-}* (**Fig. 10**). No homocigoto, uma fração de 0,30 do total de espermatogônias B sofreu um atraso no ciclo, sendo encontrada no estágio 1^S (S = ciclo subsequente). Como consequência, os espermátocitos primários gerados continuaram sua diferenciação em situação de perda do sincronismo, evidenciada pelas frações significativas ($p < 0,05$) e incomuns de PL e Z nos estádios 2^S e 3^S, respectivamente (**Fig. 10**).

Nos camundongos *Tex14^{-/-}*, o grande aumento do número de células germinativas diferenciadas dos estádios 6 para 1^S (**Fig. 9B**), e a presença significativa de preleptótenos no estágio 2^S (**Fig. 10**), evidenciam que muitas espermatogônias B que sofreram atraso no ciclo concluíram a última mitose da fase proliferativa da espermatogênese. A observação de figuras de mitose com afastamento evidente da lâmina basal nos estádios 1 e 2 (**Fig. 6B-C**) é outra evidência, pois esse comportamento foi exibido exclusivamente por algumas espermatogônias do tipo B. Contudo, o percentual correspondente de células germinativas diferenciadas geradas nos estádios 1^S em diante não foi restabelecido, mesmo que tardiamente. Ele aumentou de 20% para 32% do encontrado nos camundongos *Tex14^{+/-}* dos estádios 6 ao 1^S (**Fig. 9B**), mas depois caiu novamente para 25% nos estádios 2 e 3 subsequentes (**Fig. 11**).

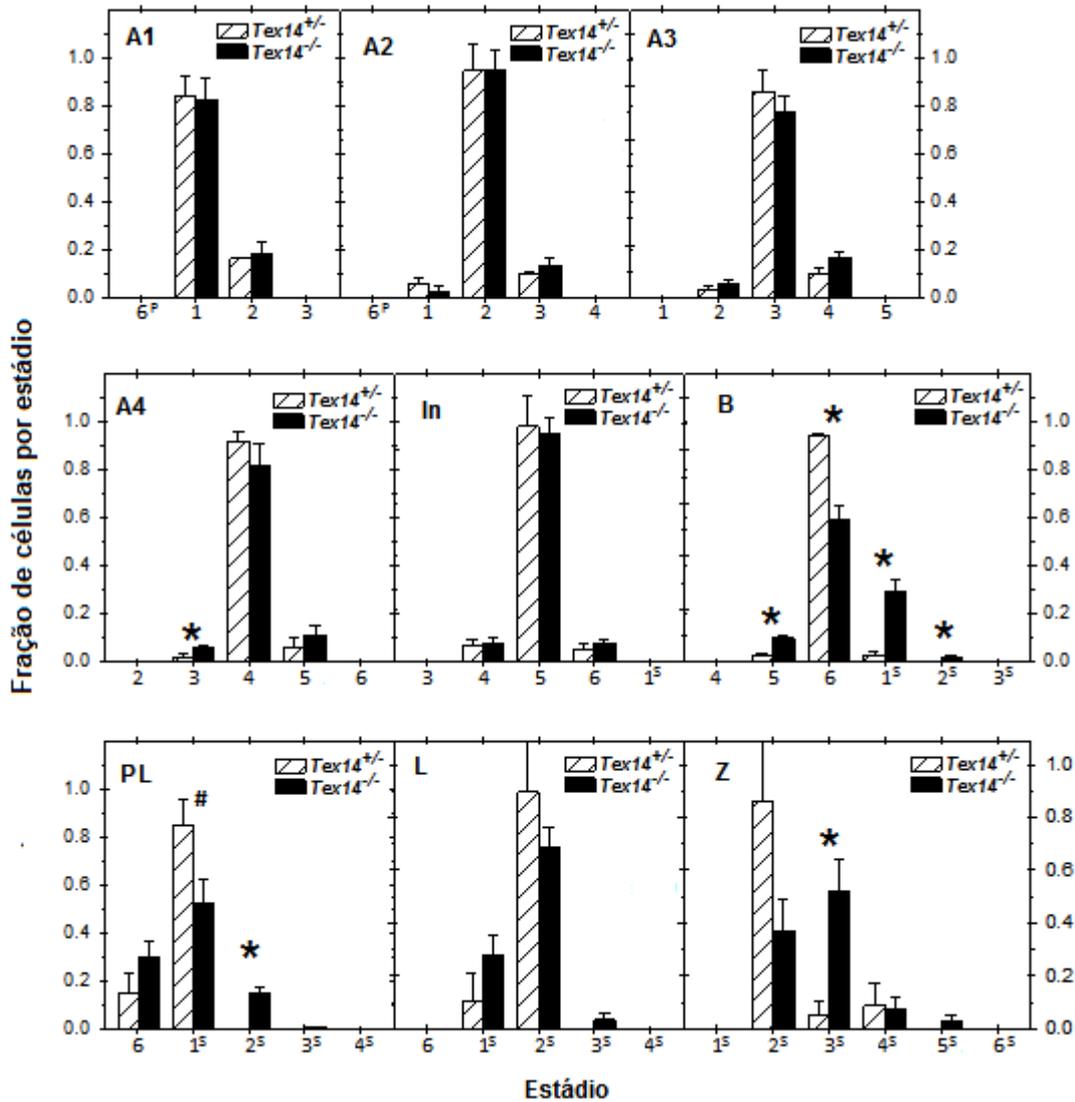


Figura 10. Distribuição de cada tipo de espermatogônia diferenciada e de espermatócito primário ao longo dos estádios espermatogoniais em camundongos *Tex14*^{+/-} e *Tex14*^{-/-}. A soma dos números de cada tipo de célula germinativa por genótipo foi normalizada para 1, no intuito de facilitar a comparação visual das diferenças. Repare que, nos camundongos *Tex14*^{+/-}, o sincronismo das células germinativas pode ser evidenciado pela presença de mais de 80% das células em um mesmo estágio. Mas nos camundongos *Tex14*^{-/-}, uma pequena fração de espermatogônias dos tipos A₄ (0,06) e B (0,10) foi originada mais precocemente, e perda evidente do sincronismo ocorreu na proliferação das espermatogônias do tipo B e se perpetuou na diferenciação dos espermatócitos primários. P = ciclo precedente; S = ciclo subsequente. In = espermatogônia indiferenciada; Espermatócitos primários em preleptóteno (PL), leptóteno (L) e zigóteno (Z). Os asteriscos indicam diferença estatística significativa entre os genótipos (p < 0,05). O jogo da velha indica significância de p = 0,06 entre as diferenças de espermatócitos primários em PL no estágio 1.

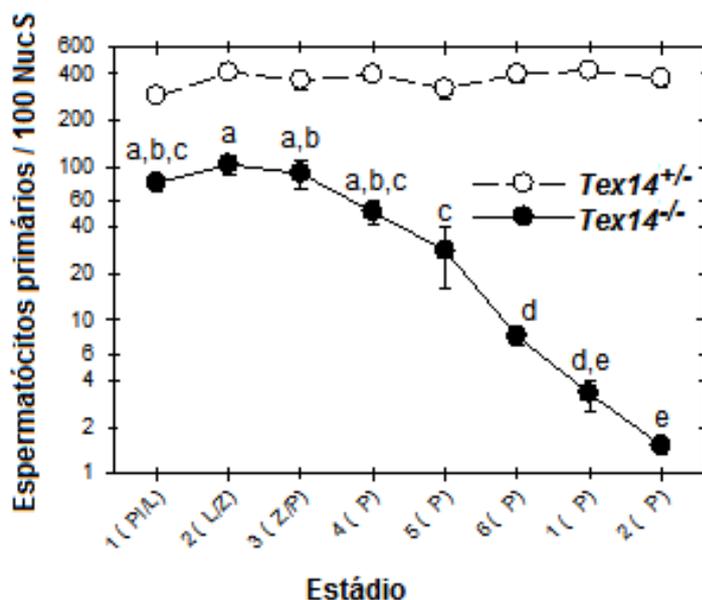


Figura 11. Cinética dos espermatoócitos primários em camundongos *Tex14^{+/-}* e *Tex14^{-/-}* ao longo dos estádios espermatogoniais. O número nos camundongos *Tex14^{-/-}* foi estatisticamente menor ($p < 0,05$) quando comparado ao número nos camundongos *Tex14^{+/-}*. Do estágio 5 em diante, houve redução progressiva e significativa ($p < 0,05$) do número de espermatoócitos primários nos camundongos *Tex14^{-/-}*, devido à severa apoptose dos paquítenos, culminando com a interrupção da espermatogênese na fase meiótica. Espermatoócitos primários em preleptóteno (PI), leptóteno (L) e zigóteno (Z) e paquíteno (P). No genótipo homocigoto, letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os estádios ($p < 0,05$). O gráfico está apresentado em escala logarítmica (base 10).

Com relação ao índice apoptótico geral⁴, as diferenças entre os camundongos *Tex14^{+/-}* e *Tex14^{-/-}* não atingiram significância estatística a $p < 0,05$, embora tenham sido significantes a $p = 0,1$. Nos camundongos *Tex14^{-/-}*, as células germinativas em apoptose, contabilizadas na base dos túbulos seminíferos, se concentraram predominantemente nos estádios 1, 2 e 6 (Fig. 12). A base é o nicho dos túbulos seminíferos povoado por espermatogônias e espermatoócitos em preleptóteno, e ambos os tipos celulares estão presentes nestes estádios (Fig. 10). Contudo, o percentual correspondente reduzido de espermatoócitos primários jovens nos camundongos homocigotos (25% do encontrado nos heterocigotos, nos estádios 2 e 3; Fig. 11), sugere como fator causal que tais apoptoses sejam de espermatogônias B e/ou de espermatoócitos em preleptóteno. Espermatoócitos em pre-

⁴Os índices apoptóticos geral e nos estádios 1, 2 e 6 podem estar subestimados nos camundongos *Tex14^{-/-}*, devido ao afastamento evidente de algumas espermatogônias do tipo B e de alguns espermatoócitos em preleptóteno em relação à lâmina basal (Fig. 6, 7 e 8). A intercorrência pode ter influenciado os valores médios dos índices e a significância das diferenças (valor p), entre os camundongos *Tex14^{+/-}* e *Tex14^{-/-}*.

leptóteno com escurecimento de núcleo e citoplasma indicativo de apoptose foram frequentemente observados no epitélio seminífero de camundongos *Tex14^{-/-}* (**Fig. 4F**).

Em concordância com esses resultados, um aumento significativo de apoptose de espermatócitos primários em preleptóteno foi demonstrado em camundongos *Tex14^{-/-}* de 10 e 14 dias de idade, por meio de microscopia e imunomarcagem com TUNEL (*TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling*), um marcador de degradação de DNA, e de ensaios de clivagem internucleossomal de DNA (Greenbaum *et al.*, 2006).

Nos camundongos *Tex14^{+/-}*, as apoptoses contabilizadas na base dos túbulos seminíferos se concentraram predominantemente nos estádios relacionados à proliferação das espermatogônias diferenciadas A₂, A₃ e A₄ (**Fig. 12**). Esse comportamento é normal, e se deve ao controle de densidade populacional que naturalmente ocorre nos túbulos seminíferos e possibilita que segmentos com densidades diferentes de espermatogônias A₁ possam progredir e chegar à fase meiótica com densidades iguais de espermatócitos primários (de Rooij, 2001).

Do estágio espermatoγονial 5 em diante, houve redução progressiva ($p < 0,05$) do número de espermatócitos primários nos camundongos *Tex14^{-/-}* (**Fig. 11**) devido à severa apoptose dos paquítenos (**Fig. 5**), culminando com a interrupção da espermatogênese na fase meiótica.

Analisando o índice mitótico geral no epitélio seminífero, não houve diferença estatística significativa entre os camundongos *Tex14^{+/-}* e *Tex14^{-/-}* ($p > 0,05$). Contudo, nos estádios espermatoγονiais 1, 2 e 3, o índice mitótico foi significativamente maior nos camundongos *Tex14^{-/-}* ($p < 0,05$) (**Fig. 12**). Nos estádios 1 e 2, o índice mitótico mais elevado é consequência da proliferação assincrônica das espermatogônias B, que se perpetuou até os referidos estádios (conforme discutido anteriormente). No estágio 3, o índice mitótico mais elevado pode estar associado à maior proliferação das espermatogônias A₃, pois uma fração significativa de 0,06 do total de espermatogônias A₄ está presente precocemente no estágio 3 dos camundongos *Tex14^{-/-}* ($p < 0,05$) (**Fig. 10**).

Com relação ao índice geral de espermatogônias BrdU positivas, também não houve diferença estatística significativa entre os camundongos *Tex14^{+/-}* e *Tex14^{-/-}* ($p > 0,05$). No entanto, o número de cortes transversais de túbulos seminíferos contendo $< 12,5\%$ de espermatogônias marcadas pelo BrdU foi significativamente menor nos camundongos *Tex14^{-/-}* ($p < 0,05$). Paralelamente, o número de cortes transversais de túbulos seminíferos contendo entre 37,5 e 62,5% de espermatogônias marcadas pelo BrdU foi significativamente maior nesses camundongos homozigotos em comparação aos heterozigotos ($p < 0,05$) (**Fig. 13**).

Esses resultados mostram que a cinética de proliferação das espermatogônias é diferente entre os camundongos *Tex14^{+/-}* e *Tex14^{-/-}*. Parte dessa diferença se deve à heterogeneidade na duração do ciclo celular nos camundongos homozigotos, que foi discreta nas espermatogônias A₃ e In, que originaram precocemente pequenas frações de espermato-

gônias A₄ e B nos estádios 3 e 5, e moderada nas espermatogônias B, que se perpetuaram em número significativo até o estágio espermatogonial 2 (Fig. 10).

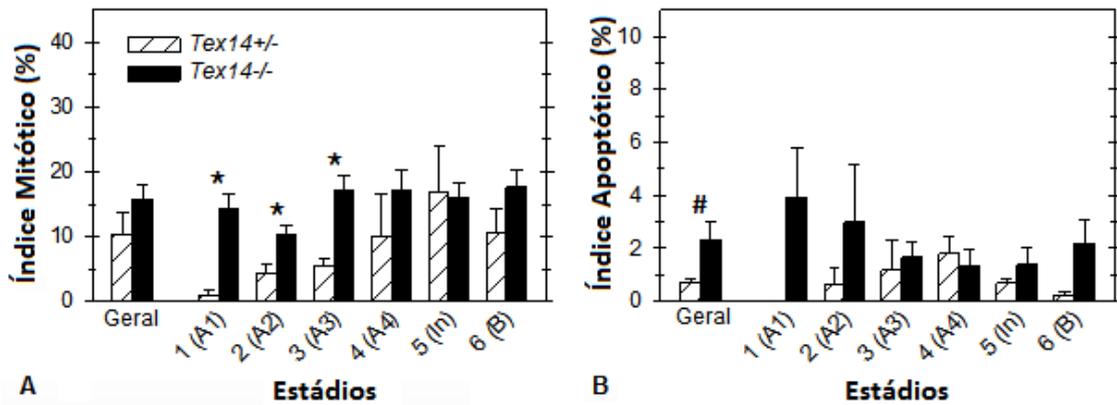


Figura 12. Índices mitótico e apoptótico (%) gerais e ao longo dos estádios espermatogoniais nos camundongos *Tex14^{+/-}* e *Tex14^{-/-}*. Os asteriscos indicam diferença estatística significativa entre os genótipos ($p < 0,05$). O jogo da velha indica significância de $p = 0,1$ entre as diferenças do índice apoptótico geral.

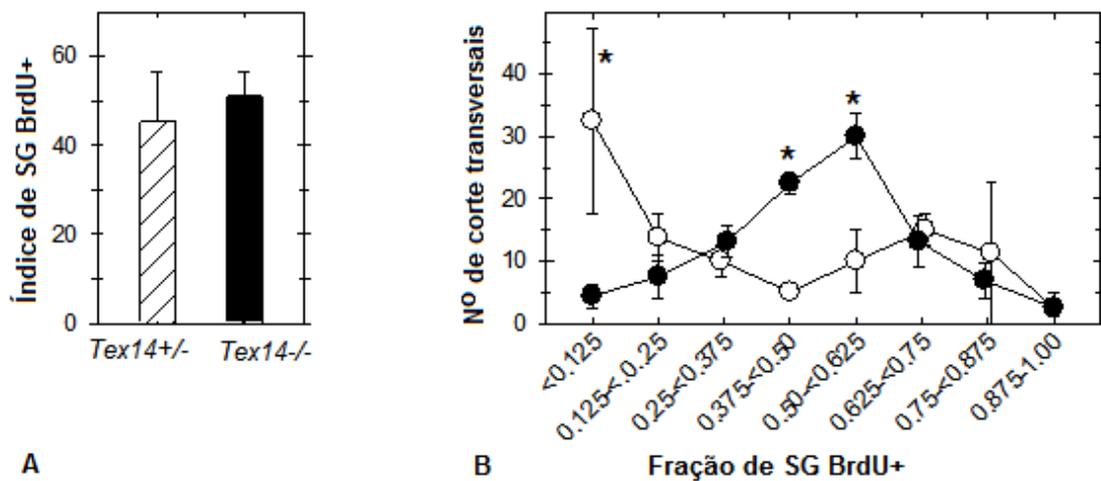


Figura 13. Índices de marcação de espermatogônias pelo BrdU nos camundongos *Tex14^{+/-}* e *Tex14^{-/-}*. (A) Índice geral de espermatogônias BrdU-positivas nos camundongos *Tex14^{+/-}* e *Tex14^{-/-}*. (B) Número de cortes transversais de túbulos seminíferos de acordo com a fração presente de espermatogônias BrdU-positivas. Círculos brancos = valores em camundongos *Tex14^{+/-}*. Círculos pretos = valores em camundongos *Tex14^{-/-}*. Os asteriscos indicam diferença estatística significativa entre os genótipos ($p < 0,05$). SG = espermatogônias.

Analisados em conjunto, os resultados mostram a importância das pontes intercelulares na composição do estoque de espermatogônias A_{indiferenciadas} disponíveis para a diferen-

ciação em A₁ e no sincronismo das mitoses espermatogoniais, particularmente da última mitose da fase proliferativa, que está intimamente atrelada à entrada coordenada dos espermatócitos em meiose. O assincronismo das células germinativas nos camundongos *Tex14^{-/-}* está didaticamente resumido na **Fig. 14**.

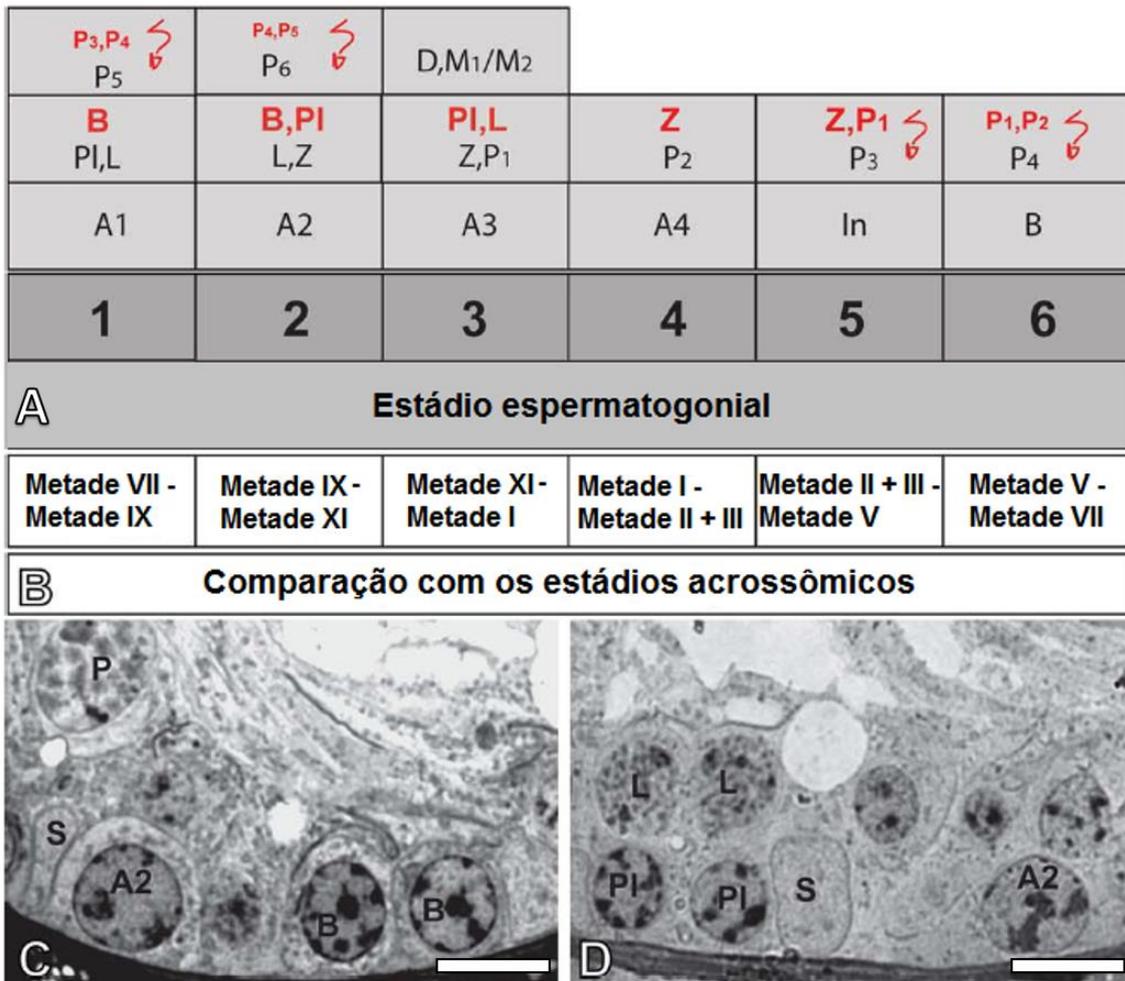


Figura 14. Assincronismo das células germinativas na ausência de pontes intercelulares em camundongos knockout *Tex14*. (A) Esquema didático da distribuição das células germinativas ao longo dos estádios espermatogoniais. As células assincrônicas no processo estão destacadas em vermelho. As setas apontadas para baixo sinalizam a depleção dos espermatócitos primários na etapa de paquíteno. O Símbolo P, se em vermelho e em menor tamanho, indica espermatócitos primários em paquíteno com menor diâmetro, por estarem assincronicamente atrasados ao longo dos estádios. (B) Correspondência dos estádios espermatogoniais com os estádios acrossômicos do ciclo do epitélio seminífero. (C) Espermatogônias B atrasadas, juntamente com espermatogônia A₂, no estágio 2. (D) Espermatócitos em preleptótenos atrasados, juntamente com espermatogônia A₂ e leptóteno, no estágio 2. Espermatócitos primários em preleptóteno (PI), leptóteno (L), zigóteno (Z), paquíteno (P), diplóteno (D) e meiose 1 (M₁); Meiose 2 (M₂), célula de Sertoli (S). (C-D) Fotomicrografia: Microscopia de Luz de Alta Resolução. Barra = 10µm.

Portanto, a cinética espermatogonial foi comprometida na proliferação das espermatogônias $A_{\text{indiferenciadas}}$, que originam o estoque comprometido a se diferenciar em A_1 , e das espermatogônias B , que originam o grupo de espermátocitos comprometidos com a meiose. Na transição das fases proliferativa e meiótica, houve um primeiro momento de apoptose que reduziu o número de espermátocitos primários em preleptóteno. Depois, os espermátocitos foram completamente eliminados do estágio espermatogonial 5 em diante.

7. CONCLUSÕES

- As pontes intercelulares são dispensáveis à sobrevivência das espermatogônias e à manutenção de sua morfologia nuclear;
- As pontes intercelulares podem estar relacionadas com a manutenção das espermatogônias B no ambiente basal, em contato com a lâmina basal;
- As pontes intercelulares são importantes para a proliferação das espermatogônias indiferenciadas e formação do estoque de células aptas à diferenciação em A₁;
- As pontes intercelulares estão relacionadas ao sincronismo da espermatogênese, particularmente das espermatogônias B em diante;
- As pontes intercelulares são importantes para a entrada coordenada dos espermatócitos primários em meiose e, conseqüentemente, para a preservação da integridade destas células no início da fase meiótica da espermatogênese;
- As pontes intercelulares são indispensáveis para a sobrevivência dos espermatócitos primários na fase de paquíteno e, conseqüentemente, para a fertilidade;

8. REFERÊNCIAS

- Abercrombie M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat. Rec.*, v.94, p.239-247, 1946.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walker P. *Molecular Biology of the Cell*. 4ª edição. National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine. Bethesda, EUA, 2002.
- Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster RL, Palmiter RD. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature*, v.337, p.373-376, 1989.
- Chiarini-Garcia H, Russell LD. High Resolution Light Microscopic Characterization of Mouse Spermatogonia. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1170-1178, 2001.
- Chiarini-Garcia H, Russell LD. Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy. *Reproduction*, v.123, n.4, p567-577, 2002.
- Chiarini-Garcia H, Meistrich ML. High-Resolution Light Microscopic Characterization of Spermatogonia. *Methods Mol. Biol.*, v.450, p.95-107, 2008.
- Chiarini-Garcia H, Parreira GG, Almeida FRCL. Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. *Methods Mol. Biol.*, v.689, p.1-23, 2011.
- Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2ª edição. Boston University, p.2000.
- de Rooij DG. Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.79, p.67-80, 1998.
- de Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v.10, n.6, p.694-701, 1998.
- de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.*, v.21, p.776-798, 2000.
- de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, v.121, p.347-354, 2001.
- de Rooij DG, de Boer P. Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutante mice. *Cytogenet. Genome Res.*, v.103, p.267-276, 2003.
- de Rooij DG. Spermatogonial stem cells. In: Turksen, K. *Adult stem cells*. Springer Science, New York, p.19-35, 2004.

Fawcett DW, Ito S, Slautterback D. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, v.5, p.453-460, 1959.

Fawcett DW. Intercellular bridges. *Experimental Cell Research*, v.8, p.174-187, 1961.

Godons B, Zemjanis R. Fine structure of spermatogonia and intercellular bridges in *Macaca nemestrina*. *Journal of Morphology*, v.131, p.431-446, 1970.

Greenbaum MP, Yan W, Wu M-H, Lin Y-N, Agno JE, Sharma M, Braun RE, Rajkovic A and Matzuk MM. Tex14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *PNAS*, v.103, n.13, p.4982-4987, 2006.

Greenbaum MP, Lang Ma, Matzuk MM. Conversion of midbodies into germ cell intercellular bridges. *Dev. Biol.*, v.305, n.2, p.389-396, 2007.

Greenbaum MP, Iwamori N, Agno JE, Matzuk MM. Mouse TEX14 is required for embryonic germ cell intercellular bridges but not female fertility. *Biology of Reproduction*, v.80, p.449-457, 2009.

Greenbaum MP, Iwamori T, Buchold GM, Matzuk MM. Germ cell intercellular bridges. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.*, v.3, n.8, 3:a005850, 2011.

Hamer G, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Kai HB, De Rooij DG. Intercellular bridges and apoptosis in clones of male germ cells. *Int. J. Androl.*, v.26, n.6, p.348-353, 2003.

Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.*, v.169, p.533-557, 1971.

Huckins C, Oakberg EF. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules: I. The normal testes. *Anat. Rec.*, v.192, p.519-528, 1978.

Iwamori T, Iwamori N, Ma L, Edson MA, Greenbaum MP, Matzuk MM. TEX14 interacts with CEP55 to block cell abscission. *Molecular and Cellular Biology*, v.30, n.9, p.2280-2292, 2010.

Iwamori T, Lin Y-N, Ma L, Iwamori N, Matzuk MM. Identification and characterization of RBM44 as a novel intercellular bridge protein. *PLoS ONE*, v.6, n.2, e17066, 2011.

Iwamori N, Iwamori T, Matzuk MM. Characterization of spermatogonial stem cells lacking intercellular bridges and genetic replacement of a mutation in spermatogonial stem cells. *PLoS ONE*, v.7, n.6, e38914, 2012.

- LeGrand EK. Genetic conflict and apoptosis. *Perspect. Biol. Med.*, v.44, p.509-521, 2001.
- Meistrich ML, Hess RA. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. *Methods Mol. Biol.*, v.927, p.299-307, 2013.
- Mishima M. Centralspindlin in Rappaport's cleavage signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v.53, p.45-56, 2016.
- Mondal G, Ohashi A, Yang L, Rowley M, Couch FJ. Tex14, a Plk1-Regulated Protein, is required for kinetochore-Microtubule Attachment and Regulation of the Spindle Assembly Checkpoint. *Molecular Cell*, v.45, p.680-695, 2012.
- Ren HP, Russell LD. Clonal development of interconnected germ cells in the rat and its relationship to the segmental and subsegmental organization of spermatogenesis. *Am. J. Anat.*, v.192, n.2, p.121-128, 1991.
- Robinson DN, Cooley L. Stable intercellular bridges in development: The cytoskeleton lining the tunnel. *Trends Cell Biol.*, v.6, p.474-479, 1996.
- Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Ed Cache River Press. United States (in press), 1990.
- Russell LD. Actin localization in male germ cell intercellular bridges in the rat and ground squirrel and disruption of bridges by cytochalasin D. *Am. J. Anat.*, v.180, n.1, p.25-40, 1987.
- Shuttlesworth GA, de Rooij DG, Huhtaniemi I, Reissmann T, Russell LD, Shetty G, Wilson G, Meistrich ML. Enhancement of A spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Endocrinology*, v.141, n.1, p.37-49, 2000.
- Smith BE, Braun RE. Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science*, v.338, n.6108, p.798-802, 2012.
- Stanley HP, Bowman JT, Romrell LJ, Reed SC, Wilkinson RF. Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.*, v.41, p.433-466, 1972.
- Ventela S, Toppari J, Parvinen M. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: Mechanisms of haploid gene product sharing. *Mol. Biol Cell*, v.14, p.2768-2780, 2003.

Vergouwen RPF, Jacobs SGPM, Huiskamp R, Davids JAG, de Rooij DG. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fertil.*, v.93, p.233-243, 1991.

Weber JE, Russell LD. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *Am. J. Anat.*, v.180, p.1-24, 1987.

Werner M, Glotzer M. Control of cortical contractility during cytokinesis. *Biochem. Soc. Trans.*, v.36, p.371-377, 2008.

Wu MH, Rajkovic A, Burns K, Yan W, Lin YN, Matzuk MM. Sequence and expression of testis-expressed gene 14 (Tex14): a gene encoding a protein kinase preferentially expressed during spermatogenesis. *Gene Expression Patterns*, v.3, p.231-236, 2003.

Yoshida S. Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis. *Reproduction*, v.144, p.293-302, 2012.

Zamboni L, Gondos B. Intercellular bridges and synchronization of germ cell differentiation during oogenesis in the rabbit. *J. Cell Biol.*, v.36, n.1, p.276-282, 1968.