

JOSÉ RAFAEL MIRANDA

**REGULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO PÓS-NATAL DAS CÉLULAS DE
SERTOLI EM RATOS**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de
doutor em Ciência Animal
Área de Concentração: Reprodução Animal
Orientador: Prof. Luiz Renato de França

**Belo Horizonte
2006**

Dedico este trabalho aos meus pais, José Miranda e Maria José, pelo apoio, compreensão e amor.
Às minhas queridas irmãs, Lídia e Raquel, que sempre me apoiaram nesta jornada.
À Elaine, pelo amor, compreensão e companheirismo.
Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao professor Luiz Renato de França, a quem muito admiro e respeito, agradeço pelos ensinamentos, amizade, confiança e oportunidade de crescimento profissional.

Aos professores Hélio Chiarini-Garcia e Gleydes Parreira, pela disponibilidade, colaboração, valiosos ensinamentos e principalmente amizade.

Aos amigos da Pós-Graduação Daniel Vilela, Fernanda Loureiro, Gleide e Marcelo, pela amizade sempre fraterna. Em especial à Fernanda Miranda, também pelo apoio na técnica de imuno+histoquímica.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular pelos momentos de descontração, apoio e trocas de ensinamentos.

Aos alunos de iniciação científica, colaboradores e colegas Daniel Carvalho, Mayra Gil e Amanda.

Ao Rubens Miranda e Adriano, pelo apoio na técnica histológica e agradável convivência.

A todos os professores do setor de Reprodução Animal, pela contribuição na minha formação profissional.

Às Coordenações do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária, e do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas.

Às funcionárias do Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Veterinária.

Enfim, a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, dedico os meus sinceros agradecimentos.

“A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida olhando-se para frente.”

Soren Kierkegaard

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob a orientação do Dr. Luiz Renato de França. A parte experimental referente ao Capítulo III foi desenvolvida na Universidade Nacional de La Plata (La Plata, Argentina), em colaboração com os professores R.S. Calandra, A. Giovambattista, M. Perello, E. Spinedi.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1.	ESTRUTURA DO TESTÍCULO.....	11
1.2.	ESPERMATOGÊNESE.....	11
1.3.	CÉLULAS DE SERTOLI.....	12
1.3.1.	Fase adulta.....	12
1.3.2.	Fase de diferenciação e desenvolvimento do testículo.....	13
1.4.	HORMÔNIOS TIREOIDEANOS.....	15
1.5.	DESENVOLVIMENTO TESTICULAR NOS PERÍODOS DA PUBERDADE E MATURIDADE SEXUAL.....	18
1.6.	LEPTINA E SUA IMPORTÂNCIA NA REPRODUÇÃO.....	18
1.7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
2.	CAPÍTULO I - EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM PROPIL-TIOURACIL (PTU), AGONISTA (LEUPROLIDE) E ANTAGONISTA (ANTIDE) DE GnRH NO DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DE RATOS WISTAR	30
	RESUMO.....	30
	ABSTRACT.....	30
2.1.	INTRODUÇÃO.....	31
2.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.2.1.	Animais.....	32
2.2.2.	Tratamentos.....	32
2.2.3.	Colheita de material.....	33
2.2.4.	Análises histológica e morfométrica dos testículos.....	33
2.2.5.	Contagem celular.....	34
2.2.6.	Concentrações plasmáticas de FSH.....	35
2.2.7.	Análises estatísticas.....	35
2.3.	RESULTADOS.....	35
2.3.1.	Animais tratados com leuprolide e avaliados durante o período de desenvolvimento pós-natal do testículo.....	35
2.3.2.	Parâmetros biométricos e histometria testicular em ratos Wistar adultos.....	38
2.3.2.1.	Células de Leydig.....	38
2.3.2.2.	Células de Sertoli e produção espermática.....	40
2.3.3.	Animais tratados com PTU e leuprolide e avaliados no período pré-púbere e na idade adulta.....	40
2.4.	DISCUSSÃO.....	46
2.4.1.	Considerações gerais.....	46
2.4.2.	Efeitos do leuprolide durante o período de desenvolvimento pós-natal do testículo.....	46
2.4.3.	Ratos Wistar adultos tratados com PTU, leuprolide e antide durante o desenvolvimento testicular.....	47
2.4.4.	Células de Leydig em ratos Wistar adultos tratados com PTU, leuprolide e antide durante o desenvolvimento testicular.....	48
2.4.5.	Efeitos do leuprolide e leuprolide+PTU durante a fase de desenvolvimento pré-puberal do testículo.....	49
2.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
3.	CAPÍTULO II - PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI NA REGIÃO DE TRANSIÇÃO ENTRE OS TÚBULOS SEMINÍFEROS E RETE TESTIS EM RATOS WISTAR PRÉ-PÚBERES	54
	RESUMO.....	54
	ABSTRACT.....	54

3.1.	INTRODUÇÃO.....	55
3.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.2.1.	Animais e tratamento.....	56
3.2.2.	Colheita de material.....	56
3.2.3.	Análises histológica e morfométrica dos testículos.....	57
3.2.4.	Contagem celular.....	57
3.2.5.	Imuno-histoquímica.....	58
3.2.6.	Processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão.....	58
3.2.7.	Análise Estatística.....	58
3.3.	RESULTADOS.....	58
3.3.1.	Avaliação morfológica.....	58
3.3.2.	Animais sacrificados aos 40 dias de idade.....	61
3.3.3.	Animais adultos.....	62
3.4.	DISCUSSÃO.....	65
3.4.1.	Considerações gerais.....	65
3.4.2.	Análise estrutural e presença de filamentos intermediários na região de transição entre os túbulos seminíferos e a <i>rete testis</i>	65
3.4.3.	Efeitos dos hormônios tireoideanos na proliferação de células de Sertoli presentes na região de transição entre os túbulos seminíferos e a <i>rete testis</i>	66
3.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
4	CAPÍTULO III - ESTRUTURA E FUNÇÃO TESTICULARES EM RATOS HIPERADIPOSOS NÃO-GENÉTICOS PRÉ-PÚBERES E ADULTOS: EFEITOS DA INDUÇÃO PÓS-NATAL DA HIPERLEPTINEMIA NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI	72
	RESUMO.....	72
	ABSTRACT.....	72
4.1.	INTRODUÇÃO.....	73
4.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.2.1.	Animais, tratamento e colheita de material.....	73
4.2.2.	Dosagens Hormonais.....	74
4.2.3.	Histologia e morfometria do testículo.....	75
4.2.4.	Contagem celular.....	75
4.2.5.	Análise estatística.....	76
4.3.	RESULTADOS.....	76
4.3.1.	Efeitos do tratamento neonatal com MSG na morfologia do testículo e nos mecanismos endócrinos em ratos machos com 30 dias de idade.....	76
4.3.2.	Estrutura e função do testículo e demais características fenotípicas de ratos tratados com MSG adultos.....	78
4.4.	DISCUSSÃO.....	81
4.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1.	Dados biométricos e morfométricos de ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, em associação com leuprolide e antide, e sacrificados aos 100 dias de idade.....	39
-----------	---	----

Capítulo II

Tabela 1.	Dados biométricos e morfométricos de ratos Wistar controles e tratados com PTU entre 21 e 40 dias de idade e sacrificados aos 40 dias.....	62
Tabela 2.	Dados biométricos e morfométricos de ratos Wistar controles e tratados	

com PTU entre 21 e 40 dias de idade e sacrificados aos 160 dias.....	65
--	----

Capítulo III

Tabela 1.	Dados biométricos e morfométricos de ratos controle e tratados com glutamato monossódico (MSG), sacrificados aos 30 dias de idade.....	77
Tabela 2.	Concentrações hormonais plasmáticas em ratos controle e tratados com glutamato monossódico (MSG), sacrificados aos 30 dias de idade.....	78
Tabela 3.	Dados biométricos e morfométricos de ratos controle e tratados com glutamato monossódico (MSG), sacrificados aos 120 dias de idade.....	80
Tabela 4.	Concentrações hormonais em ratos controle e tratados com glutamato monossódico (MSG), sacrificados aos 120 dias de idade.....	81

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1.	Proliferação de células de Sertoli em ratos.....	14
-----------	--	----

Capítulo I

Figura 1.	Concentrações plasmáticas de FSH em ratos Wistar controles e tratados com leuprolide, em diferentes idades após o nascimento.....	35
Figura 2.	Índice gonadossomático em ratos controles e tratados com leuprolide, em diferentes idades após o nascimento.....	36
Figura 3.	Diâmetro de túbulos seminíferos em ratos controles e tratados com leuprolide, em diferentes idades após o nascimento.....	37
Figura 4.	Comprimento de túbulos seminíferos em ratos controles e tratados com leuprolide, em diferentes idades após o nascimento.....	37
Figura 5.	Vista panorâmica do parênquima testicular dos ratos Wistar controles e tratados, sacrificados aos 30 dias de idade.....	41
Figura 6.	Vista panorâmica do parênquima testicular dos ratos Wistar controles e tratados, sacrificados aos 36 dias de idade.....	41
Figura 7.	Vista panorâmica do parênquima testicular dos ratos Wistar controles e tratados, sacrificados aos 43 dias de idade.....	42
Figura 8.	Vista panorâmica do parênquima testicular dos ratos Wistar controles e tratados, sacrificados aos 100 dias de idade.....	42
Figura 9.	Peso testicular (mg) de ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, leuprolide e PTU + leuprolide, e avaliados em diferentes idades.....	43
Figura 10.	Índice gonadossomático (%) de ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, leuprolide e PTU + leuprolide, e avaliados em diferentes idades.....	43
Figura 11.	Diâmetro tubular (µm) de ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, leuprolide e PTU + leuprolide, e avaliados em diferentes idades.....	44
Figura 12.	Comprimento total de túbulos seminíferos (m) em ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, leuprolide e PTU + leuprolide, e avaliados em diferentes idades.....	45
Figura 13.	Número de células de Sertoli por testículo em ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, leuprolide e PTU + leuprolide, e avaliados em diferentes idades.....	45

Capítulo II

Figura 1.	Microscopia eletrônica de transmissão da região de transição entre os túbulos seminíferos e a rete testis em ratos Wistar com 26 dias de idade.....	59
Figura 2.	Região de transição (RT) entre os túbulos seminíferos e a rete testis em testículos de ratos Wistar imaturos e com 36 dias de idade.....	60
Figura 3.	Região de transição (RT) entre túbulos seminíferos e a rete testis de ratos	

	Wistar imaturos e com 28 dias de idade.....	61
Figura 4.	Secções transversais de túbulos seminíferos de ratos do grupo controle e tratado com PTU, aos 40 dias de idade.....	63
Figura 5.	Secções transversais de túbulos seminíferos (TS) de ratos do grupo controle e tratado com PTU, aos 100 dias de idade.....	64
 Capítulo III		
Figura 1.	Número total de células de Sertoli (CS) e células de Leydig (CL) por testículo em ratos Sprague-Dawley aos 30 e 120 dias de idade.....	77
Figura 2.	Secções transversais de túbulos seminíferos de ratos Sprague-Dawley com 30 dias de idade.....	79
Figura 3.	Secções transversais de túbulos seminíferos e compartimento intertubular em ratos controle e hiperleptinêmicos com 30 dias de idade.....	79
Figura 4.	Visão panorâmica da estrutura testicular em ratos adultos controle (A) e hiperleptinêmicos.....	80

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Estrutura do testículo

O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina e que apresenta-se revestido por uma espessa cápsula conjuntiva, a túnica albugínea. Este órgão é constituído por dois compartimentos: o compartimento tubular e o intertubular (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998). No primeiro, responsável pela produção de espermatozoides, encontram-se os túbulos seminíferos, os quais conectam-se através de duas extremidades à rede testicular ou *rete testis*, localizada na região do mediastino testicular. Os túbulos seminíferos são constituídos pela túnica própria, epitélio seminífero e lume. Na túnica própria são observadas as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e as fibras colágenas. Dois tipos celulares de origem embriológica diferentes estão presentes no epitélio seminífero: as células de Sertoli, de origem somática, e as células germinativas ou espermatogênicas. No lume tubular encontram-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozoides. Já o compartimento intertubular é constituído de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo, macrófagos, mastócitos e células de Leydig. Estas últimas produzem os andrógenos, os quais são responsáveis pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e pela manutenção da espermatogênese nos animais sexualmente maduros (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998). Com exceção das células germinativas que se originam do epiblasto, a grande maioria das células somáticas constituintes dos testículos é procedente dos ductos mesonéfricos e do epitélio celomático (Karl & Capel, 1998; Merchant-Larios & Moreno-Mendoza, 1998; Capel, 2000).

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na grande maioria das espécies de mamíferos, de 70 a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998; França et al., 2005). Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998). No camundongo e no rato, cerca de 20 e 30 túbulos seminíferos estão presentes em cada testículo,

respectivamente (Bascom & Osterud, 1925; Setchell et al., 1994). De maneira geral, entre 10 a 15 metros de túbulos seminíferos são encontrados por grama de testículo em mamíferos (Setchell et al., 1994; França & Russell, 1998). Assim, por exemplo, o comprimento tubular total é cerca de 4 metros no camundongo e 6000 metros no suíno (Bascom & Osterud, 1925; França & Russell, 1998). Já o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está na faixa compreendida entre 180 e 350µm (Setchell et al., 1994; França & Russell, 1998)

1.2. Espermatogênese

A espermatogênese é um processo cíclico altamente organizado que ocorre nos túbulos seminíferos, onde as espermatogônias diplóides se diferenciam numa célula haplóide madura, o espermatozoide. Este processo, composto por diferentes associações celulares, é um dos mais produtivos sistemas de auto-renovação do corpo animal, durando cerca de 30 a 78 dias nos mamíferos já investigados (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998). Baseado em considerações morfofuncionais, durante sua evolução, a espermatogênese pode ser dividida em três fases: (1) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; (2) fase meiótica ou espermatocitogênica, onde o material genético dos espermatócitos é duplicado, recombinado e segregado, sendo esta fase importante para a diversidade genética entre membros da mesma espécie; (3) e fase espermiogênica ou de diferenciação, na qual células haplóides, as espermátides, se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os oócitos (Russell et al., 1990). Embora o processo espermatogênico seja essencialmente o mesmo em todos os mamíferos, existem características específicas entre as diferentes espécies. Estas particularidades estão relacionadas com o número de gerações espermatogoniais e particularidades morfológicas das células germinativas presentes nas várias fases do processo espermatogênico, principalmente nas espermátides alongadas.

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células

espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso e sim em associações celulares distintas denominadas de estádios, ordenados de modo espécie-específico (Russell et al., 1990; França, 1991; França et al., 2005). Estes estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo. Esta seqüência, assim ordenada, constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (Leblond & Clermont, 1952; Ortavant et al., 1977; Russell et al., 1990). De maneira geral, em torno de 4,5 ciclos são necessários - desde espermatogônia do tipo A até a liberação das espermátides no lume tubular - para que o processo espermatogênico se complete (Amann & Schanbacher, 1983; França & Russell, 1998).

Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, o mais empregado é aquele baseado na forma e na localização dos núcleos das espermátides e na presença de figuras de divisões meióticas (Roosen-Runge & Giesel Jr., 1950; Courot et al., 1970; Berndtson, 1977; Ortavant et al., 1977; Guerra, 1983; França, 1991; França & Russell, 1998). Este sistema, designado como método da morfologia tubular por Berndtson (1977), permite a obtenção de oito estádios do ciclo. Outra classificação, designada como método do sistema acrossômico, é baseada nas características das espermátides, em particular na forma do núcleo e no desenvolvimento do acrossoma. Com este método, o número de estádios para cada espécie é variado, sendo, por exemplo, definidos seis estádios para o homem, doze para camundongos e quatorze para o rato (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998).

Durante o processo espermatogênico, as células de Sertoli e as células germinativas interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. Existem diversas formas de junções intercelulares entre estes dois tipos celulares, incluindo-se os desmossomos, as junções do tipo "gap", as junções envolvendo filamentos de actina, conhecidas como especializações ectoplasmáticas, e os complexos túbulo-bulbares. Apesar de serem postuladas várias funções para estes componentes juncionais, existem ainda poucas evidências experimentais para apoiar o papel preciso dos mesmos (Russell & Griswold, 1993; Moroi et al, 1998; Mitic et al, 2000; Mulholland et al., 2001; Parreira et al., 2002; Cheng & Mruk, 2002). No

entanto, fica bastante evidente a necessidade de interação funcional entre as células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente as células de Sertoli, células de Leydig e células mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Skinner, 1991; Jégou, 1993; Spiteri-Grech & Nieschlag, 1993; Pescovitz et al., 1994; Russell et al., 1994; Griswold, 1995; Schlatt et al., 1997; França & Russell, 1998; Skinner, 2005). A integridade funcional da membrana basal elaborada pelas células de Sertoli e células mióides é também essencial para o processo espermatogênico (Dym, 1994).

1.3. Células de Sertoli

1.3.1. Fase adulta

Em mamíferos sexualmente maduros, as células de Sertoli formam dois compartimentos permanentes no epitélio seminífero denominados de compartimento basal e adluminal, e um compartimento transitório chamado de intermediário. No compartimento basal localizam-se as espermatogônias e os espermátócitos primários no início da prófase meiótica (pré-leptóteno/leptóteno/zigóteno), enquanto no compartimento adluminal são encontrados os espermátócitos primários em fases mais adiantadas, os espermátócitos secundários, além de espermátides arredondadas e alongadas. O compartimento intermediário, por sua vez, é formado quando espermátócitos em leptóteno/zigóteno transitam do compartimento basal para o adluminal, envolvendo sucessivas formação e dissolução de junções celulares do tipo oclusivas (*tight junctions*). Estas junções se formam nas superfícies baso-laterais de células de Sertoli adjacentes, sendo responsáveis pela compartimentalização do epitélio seminífero e formação da barreira de célula de Sertoli (barreira hemato-testicular; Russell et al., 1990). Desta forma, o compartimento adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado e imunologicamente privilegiado, condição esta considerada essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Sharpe, 1994).

As células de Sertoli desempenham papel fundamental na regulação da espermatogênese (Russell & Griswold, 1993). Além de promover a compartimentalização já

descrita do epitélio seminífero, estas células desempenham outras funções tais como: nutrição e fornecimento de suporte físico (sustentação) para as células germinativas em desenvolvimento, manutenção da integridade do epitélio seminífero, secreção de fluido testicular principalmente em direção ao lume tubular, secreção de fatores de crescimento e proteínas, participação na espermição liberando as espermátides no lume tubular, fagocitose de células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma (corpo residual) remanescente após a liberação das espermátides, esteroidogênese e metabolismo de esteróides (Russell et al., 1990; Carreau et al., 1999; Hess, 2000; França & Chiarini-Garcia, 2005). As células de Sertoli são ainda alvo de hormônios, mediando a ação do FSH e da testosterona na espermatogênese, provavelmente de maneira cíclica (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998; França & Chiarini-Garcia, 2005).

O fluido testicular secretado pelas células de Sertoli possui substâncias e fatores importantes para a função dos ductos excurrentes (rete testis, ductulos eferentes e ducto epididimário) e maturação espermática, servindo também como veículo de transporte para os espermatozóides (Ilio & Hess, 1994; Klinefelter & Hess, 1998). Esta secreção também ocorre em direção ao compartimento intertubular, estando envolvida com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo, tais como células mióides, células de Leydig e células musculares lisas dos vasos (Russell & Griswold, 1993; Sharpe, 1994; França & Russell, 1998; França & Chiarini-Garcia, 2005; Skinner, 2005).

1.3.2. Fase de diferenciação e desenvolvimento do testículo

O período de proliferação dos diversos tipos celulares encontrados no testículo ocorre em épocas distintas, sendo cada um deles regulado por fatores específicos, os quais têm origem tanto intra quanto extratesticular (Orth, 1993). As células de Sertoli são as primeiras células somáticas a se diferenciarem no testículo e expressam o Sry, gene responsável pela determinação do sexo masculino, o qual desempenha papel fundamental na diferenciação e remodelação das gônadas (Capel, 1998). Nesta fase, as interações das células de Sertoli entre si e com as células germinativas via fator neural de adesão celular (NCAM) são cruciais para a

formação dos cordões testiculares e os eventos iniciais que propiciarão o estabelecimento do processo espermatogênico (Orth & Jester, 1995). Também neste período, as células de Sertoli produzem o hormônio anti-Mülleriano (AMH) responsável pela regressão dos ductos de Müller ou paramesonéfricos (Pelliniemi et al., 1993). Já nesta fase do desenvolvimento, as células de Sertoli apresentam filamentos intermediários do tipo vimentina (Russell & Griswold, 1993), que podem ser utilizados, através de técnicas imuno-histoquímicas, como marcador específico destas células, diferenciando-as das células germinativas (Mali et al., 1987).

Em ratos e camundongos, a proliferação das células de Sertoli ocorre principalmente na fase final do período fetal e estende-se por duas a três semanas após o nascimento (Figura 1; Clermont & Perey, 1957; Steinberger & Steinberger, 1971; Orth, 1982; Almirón & Chemes, 1988; Bortolussi et al., 1990; Vergouwen et al., 1991). Em bovinos e caprinos esta fase proliferativa prolonga-se até 6-10 semanas de idade (Sharpe, 1994). Em suínos, as células de Sertoli possuem duas fases de proliferação após o nascimento: a primeira mais intensa ocorre no primeiro mês de vida, enquanto a segunda ocorre antes da puberdade (entre três a quatro meses de vida). Estas duas fases de proliferação estão correlacionadas com concentrações plasmáticas mais elevadas de FSH (França et al., 2000). O período de encerramento da fase mitótica das células de Sertoli coincide com o início de proliferação dos espermatozócitos primários, formação das junções de oclusão, início de maturação das células de Sertoli, secreção de fluido e formação do lume tubular (Russell et al., 1989). Como cada célula de Sertoli possui capacidade de suporte para células germinativas relativamente fixa para cada espécie, o tamanho potencial do testículo e da produção espermática é estabelecido já nesta etapa do desenvolvimento testicular (Berndtson et al., 1987; Hochereau-De Reviers et al., 1987; Orth et al., 1988; Orth, 1993; Johnson et al., 1994; França et al., 2005). Após a puberdade, é considerado que as células de Sertoli não mais se dividem (França & Russell, 1998; França et al., 2005).

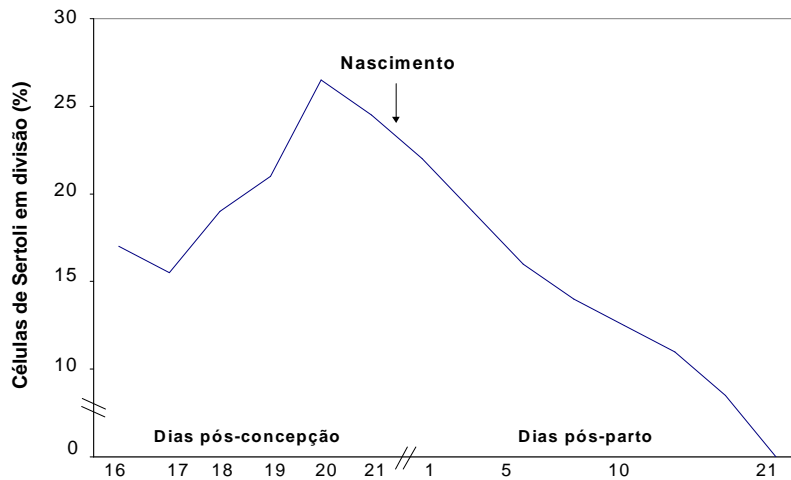


Figura 1 – Proliferação de células de Sertoli em ratos.

Fonte: Orth, 1982

O hormônio folículo-estimulante (FSH) é uma glicoproteína que se liga a receptores específicos localizados na membrana plasmática das células de Sertoli, sendo considerado como o principal fator mitogênico para estas células. Este hormônio é sintetizado e secretado pelos gonadotrofos localizados na adenohipófise, sob a ação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) produzido no hipotálamo. Seu controle de retroalimentação negativa é exercido pela inibina, secretada pelas células de Sertoli em interação com as células germinativas (De Kretser & Mcfarlane, 1996; De Kretser et al., 2001). Durante o desenvolvimento perinatal em ratos, a concentração plasmática de FSH eleva-se nos períodos de maior proliferação das células de Sertoli. Nos últimos quatro dias de gestação, observa-se uma elevação de cerca de duas vezes nas concentrações plasmáticas de FSH, até atingir aproximadamente 250 ng/mL ao nascimento. Aos 5 dias de idade, esta concentração já atingiu 400 ng/mL. Os níveis de FSH plasmáticos atingem um pico de 800 ng/mL aos 35 dias de idade, estabilizando-se aos 50 dias de idade em 400 ng/mL (Chowdhury & Steinberger, 1976, Ketelslegers et al., 1978).

Trabalhos experimentais envolvendo a elevação ou supressão dos níveis de FSH no período de proliferação das células de Sertoli, mostram que o número destas células pode ser aumentado ou reduzido, respectivamente

(Hochereau-De Reviers & Courot, 1978; Orth, 1984; Van Vorstenbosch et al., 1987; Orth, 1993; Sharpe, 1994; Meachem et al., 1996; Singh & Handelsman, 1996; Miranda, 2002; Allan et al., 2004). Alguns trabalhos evidenciaram que a maior expressão dos receptores de FSH nas células de Sertoli é coincidente com a elevação no índice de proliferação destas células no período perinatal (Warren et al., 1984; Bortolussi et al., 1990).

O efeito mitogênico do FSH sobre as células de Sertoli imaturas é mediado pelo aumento dos níveis intracelulares do AMP cíclico (Dorrington et al., 1972; Orth & Boehm, 1990). Em animais adultos sabe-se que a indução na produção de AMPc pelo FSH nas células de Sertoli está altamente relacionada com a concentração de receptores para FSH (Kangasniemi et al., 1990). Em ratos, a concentração de receptores para FSH no testículo aumenta cerca de três vezes após o nascimento, atingindo um pico aos 15 dias de idade. Em seguida, a concentração destes receptores reduz até níveis encontrados no adulto, similares aos observados no testículo aos 2 dias de idade (Ketelslegers et al., 1978; Bortolussi et al., 1990). Esta variação na concentração reflete o aumento nos receptores de FSH devido à proliferação das células de Sertoli entre 2 e 15 dias de idade após o nascimento, com subsequente diluição das células de Sertoli devido à expansão das células

germinativas (Orth, 1984; Meachem et al., 1996). No entanto, pouco se sabe sobre os eventos específicos que causam o início da divisão das células de Sertoli em resposta ao FSH. Especula-se que o estrógeno, produzido pela aromatização de andrógenos nas células de Sertoli imaturas, sob o estímulo do FSH, pode exercer papel mediador importante na divisão celular (Ulisse et al., 1994). A ação da inibina neste processo, bem como de β -endorfina, via células de Leydig, também é possível (Orth, 1993; Sharpe, 1994; De Kretser & McFarlane, 1996). Estudos recentes mostram que vários outros fatores, principalmente da superfamília do TGF β , parecem estar envolvidos na regulação das células de Sertoli (Loveland & Robertson, 2005).

Tanto agonistas quanto antagonistas de GnRH têm sido utilizados em diversos trabalhos para estudar a função espermatogênica em ratos, principalmente a proliferação espermatogonial (Meistrich & Kangasniemi, 1997; Ogawa et al., 1998; Shetty et al., 2000; Shuttlesworth et al., 2000; Dobrinski et al., 2001; Meistrich et al., 2001). O Leuprolide (Leuprolide acetate, TAP Pharmaceuticals Inc.) é um potente agonista de GnRH, utilizado para suprimir os níveis séricos de gonadotrofinas (FSH e LH) por várias semanas (Ogawa et al., 1998; Meistrich et al., 2001) pelo fato de causar “exaustão” dos gonadotrofos. A ação deste agonista de GnRH é complexa. Após estimular inicialmente a liberação de gonadotrofinas pela hipófise, esta droga inibe os receptores hipofisários para GnRH, promovendo redução nos estímulos para a liberação de gonadotrofinas (Meistrich et al., 2001). No nosso conhecimento, não existe nenhum relato na literatura a respeito do efeito desta droga no testículo, durante a fase de desenvolvimento pós-natal do mesmo. Já os antagonistas de GnRH se ligam fortemente a receptores hipofisários deste hormônio, inibindo a liberação de FSH e LH pelos gonadotrofos (Halmos et al., 1996).

Está bem estabelecido que andrógenos exercem um papel central na masculinização do trato reprodutivo, genitália e outros órgãos durante o processo de diferenciação sexual no macho (Hughes, 2001; Sultan et al., 2001). Em adultos, a ação dos andrógenos nos túbulos seminíferos é essencial para espermatogênese quantitativamente normal e fertilidade plena. Camundongos adultos “knockout” para receptores de andrógenos (ARKO)

apresentaram redução na expressão de receptores para FSH, indicando que os andrógenos podem exercer papel na regulação destes receptores em animais adultos. É possível que um dos efeitos estimulatórios de andrógenos nas células de Sertoli seja via aumento da sensibilidade ao FSH (Johnston et al., 2004). No entanto, dados recentes demonstraram que, provavelmente, andrógenos exercem um papel fisiológico importante na proliferação das células de Sertoli em camundongos (Johnston et al., 2004; Zhou et al., 2005) e macacos (Schlatt et al., 1995; Ramaswamy et al., 2000) nos períodos fetal e neonatal. Tan et al. (2005) evidenciaram que estes efeitos são provavelmente mediados por outro tipo celular do testículo, presumivelmente as células mióides peritubulares.

1.4. Hormônios tireoideanos

Os hormônios tireoideanos, a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3), são essenciais para o crescimento e regulação do metabolismo de praticamente todos os tecidos dos vertebrados. Os receptores destes hormônios são membros de uma superfamília que inclui os receptores de hormônios esteróides, vitamina D e ácido retinóico (Cooke, 1996). Os sítios específicos de ligação dos hormônios tireoideanos podem ser detectados na membrana plasmática, citosol, mitocôndria e envoltório nuclear, sendo capazes de influenciar o metabolismo, crescimento, desenvolvimento, metamorfose e diferenciação.

Em ratos, os receptores tireoideanos são codificados por dois diferentes genes: TR α e TR β . O TR α dá origem ao TR α 1, TR α 2 e TR α 3, enquanto o TR β ao TR β 1 e TR β 2 (Jannini et al., 1995; Cooke, 1996; Buzzard et al., 2000). Destes receptores, o TR α 2 e TR α 3 não possuem sítio de ligação hormonal, sendo considerados como inibidores da ação dos hormônios tireoideanos. O TR β 2 é expresso quase que exclusivamente na adenohipófise (Hodin et al., 1989). Alguns trabalhos indicam que TR β 1 pode estar envolvido no desenvolvimento das células de Sertoli, mas estes dados ainda são controversos. Ao passo que a presença de TR β 1 foi descrita nas células de Sertoli de ratos pré-púberes (Palmero et al., 1995; Buzzard et al., 2000), outros trabalhos não foram capazes de evidenciar a presença destes receptores nas células de Sertoli de ratos

e humanos (Janini et al, 1994; Janini et al. 2000; Canale et al., 2001). Holsberger et al. (2005), trabalhando com camundongos knockouts para TR α e TR β (TR α KO e TR β KO, respectivamente), evidenciaram que TR α 1, mais do que o TR β 1, é crítico para a ação do T3 na proliferação das células de Sertoli em camundongos.

De acordo com Cooke (1996) e Buzzard et al. (2000), o TR α 1 é expresso no núcleo das células de Sertoli em proliferação, diminuindo sua expressão de forma coincidente com a fase em que estas células cessam sua atividade mitótica. Buzzard et al. (2000) relatam ainda, além da presença destes receptores nas células de Leydig, a ocorrência de TR α 1 em espermatogônias intermediárias e espermatócitos em paquíteno. Estes resultados sugerem que os hormônios tireoideanos podem ser muito importantes para a função testicular nos animais adultos, funcionando, provavelmente, como moderador para a sobrevivência das células germinativas (Buzzard et al., 2000).

O PTU (6-propil-2-tiouracil) é uma droga bociogênica que inibe a captação de iodo e a síntese de tiroxina (T4) na glândula tireóide, além de impedir a deiodinização periférica do hormônio T4 em triiodotironina (T3). Diversos trabalhos demonstraram que o hipotireoidismo neonatal transitório causado pelo PTU é capaz de aumentar significativamente o número de células de Sertoli, o peso dos testículos e a produção espermática em ratos, camundongos, hamsters, galos domésticos e tilápias (Cooke & Meisami, 1991; Cooke, 1991; Cooke et al., 1992; Cooke et al., 1993; Joyce et al., 1993; Hess et al., 1993; Cooke et al., 1994; Kirby et al., 1996; Miranda, 2002; Matta, 2002). Estudos mais detalhados nos animais tratados com PTU mostraram que a redução na concentração dos hormônios tireoideanos torna mais lenta a transição da fase proliferativa para a fase madura das células de Sertoli, resultando em prolongamento da fase mitogênica e aumento da população adulta deste tipo celular (van Haaster et al., 1992; Hess et al., 1993; Bunick et al., 1994; França et al., 1995; Cooke, 1996; Cooke et al., 2005). A imaturidade das células de Sertoli devido ao tratamento com PTU resulta em retardo na abertura do lume dos túbulos seminíferos e inabilidade destas células em sustentar estágios avançados do

desenvolvimento das células espermatogênicas, acarretando degenerações das células germinativas e diminuição do tamanho dos testículos neste período (França et al., 1995). Após o tratamento com PTU, o restabelecimento do eutireoidismo possibilita a maturação completa das células de Sertoli. A população aumentada de células de Sertoli interage com a população de células espermatogoniais, estabelecendo espermatogênese completa (Hess et al., 1993). Isto acarreta mudanças morfológicas e funcionais, com conseqüente aumento do tamanho dos testículos e da produção espermática nas espécies acima citadas.

De maneira antagônica aos efeitos do hipotireoidismo, elevadas concentrações plasmáticas de T3 em ratos imaturos levam à redução no número de células de Sertoli, da produção espermática e do peso testicular nos animais adultos, em virtude da diminuição do período mitogênico e aceleração do processo de maturação das células de Sertoli (van Haaster et al., 1993; Cooke, 1995).

Desta forma, fica bem evidente que os hormônios tireoideanos são responsáveis pela maturação das células de Sertoli, exercendo papel muito importante para a função testicular durante o período de desenvolvimento pós-natal dos testículos (van Haaster et al., 1992; Cooke et al., 1994; Bunick et al., 1994; França et al., 1995; Cooke, 1996). No entanto, o mecanismo molecular pelo qual T3 induz o encerramento da fase proliferativa das células de Sertoli ainda não é totalmente conhecido. Trabalhos recentes sugerem que os hormônios tireoideanos regulam a proliferação das células de Sertoli através de mecanismos envolvendo o p21 e p27 (Cooke et al., 2005; Holsberger & Cooke, 2005; Holsberger et al., 2005).

A progressão no ciclo celular é regulada por várias proteínas-chave, tais como ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs). Estas por sua vez podem ser reguladas por inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDKIs), como a proteína p27^{KIP1}. Beumer et al. (1999) observaram que, em camundongos adultos, a p27^{KIP1} é expressa em células de Sertoli. Porém, a expressão desta proteína está reduzida no período em que estas células estão proliferando ativamente. Em camundongos knockouts para p27^{KIP1}, observou-se aumento de cerca de 100% no peso testicular (Nakayama et al., 1996; Kiyokawa et

al., 1996; Fero et al., 1996), sugerindo uma possível relação entre a expressão de p27^{KIP1} e a proliferação de células de Sertoli. Especificamente, o hipotireoidismo reduz os níveis de p27^{KIP1} nas células de Sertoli, permitindo uma progressão do ciclo celular e um prolongamento do período de proliferação destas células, ao passo que o hipertireoidismo produz os efeitos opostos (Holsberger et al., 2003). Assim, os efeitos do T3 na proteína p27^{KIP1} deve ser o mecanismo crítico pelo qual este hormônio induz o encerramento da fase proliferativa das células de Sertoli (Cooke et al., 2005; Holsberger & Cooke, 2005; Holsberger et al., 2005).

Estes resultados indicam que além das gonadotrofinas (FSH e LH) e dos hormônios esteróides, os hormônios tireoideanos também podem ser considerados como fatores extratesticulares importantes na regulação do desenvolvimento pós-natal do testículo (Cooke, 1996). No entanto, paradoxalmente, os efeitos do tratamento com PTU levam à redução das concentrações plasmáticas de LH e FSH durante e após o período de tratamento, provavelmente devido à diminuição de tamanho da adenohipófise em cerca de 20% a 30% (Kirby et al., 1992). A elevação da produção de inibina conseqüente ao maior número de células de Sertoli presente nos testículos também pode ser responsável pela redução nas concentrações séricas de FSH (Ultee-van Gessel et al., 1988; Sharpe et al., 1999).

Além de seus efeitos sobre a população de células de Sertoli, o tratamento com PTU também influencia o número e a função das células de Leydig (Hardy et al., 1993; Antony et al., 1995; Hardy et al., 1996; Mendis-Handagama et al., 1998; Teerds et al., 1998; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2004). Estudos morfométricos indicaram que o número de células de Leydig em animais tratados com PTU foi 70% maior do que nos animais controle. No entanto, tanto o tamanho destas células quanto o número de receptores para LH e o potencial esteroidogênico das mesmas estavam reduzidos (Hardy et al., 1993), justificando o não aumento nas concentrações plasmáticas de testosterona nos animais tratados. Mendis-Handagama et al. (1998) demonstraram que, no período neonatal, ratos tratados com PTU apresentam prolongamento da fase de proliferação das células mesenquimais, retardando o início da

diferenciação em células precursoras de células de Leydig. Assim, um maior número de células mesenquimais se diferencia nestas precursoras após a suspensão do tratamento com PTU. No entanto, em suínos adultos tratados com PTU no período neonatal, o número total de células de Leydig e as concentrações plasmáticas de testosterona não foram alterados, mostrando que o padrão de proliferação e de maturação das células de Leydig em suínos difere substancialmente daquele observado em ratos (Silva Jr., 2000; Cooke et al., 2005).

Apesar da magnitude não ser a mesma, os efeitos do tratamento com o PTU em ratos, camundongos e hamsters são bastante semelhantes, sugerindo que seu mecanismo de ação pode ser o mesmo para diversas espécies de roedores (Cooke et al., 1994). No entanto, vale ressaltar que no hamster a dose de PTU necessária para produzir efeitos análogos aos observados em ratos é muito superior (1% vs. 0,006% a 0,1%) (Cooke et al., 1994), alertando para a individualidade de cada espécie em relação à resposta ao tratamento e para as prováveis dificuldades em se estender esta metodologia às espécies domésticas de interesse econômico. Assim, estudos no galo doméstico (Kirby et al., 1996) mostraram que, apesar do hipotireoidismo neonatal induzido pelo PTU ter levado ao aumento de tamanho do testículo e da produção espermática em cerca de 100%, os mecanismos envolvidos nestes efeitos foram aparentemente distintos. Dependendo do período de início do tratamento, as aves tratadas apresentaram espermatogênese anormal e puberdade precoce, aspectos estes não observados nos experimentos com animais de laboratório. Desta forma, o controle da função e a regulação da maturação do testículo pelos hormônios tireoideanos podem envolver mecanismos distintos nas diferentes espécies. Por exemplo, em suínos, tratamento com PTU durante o período de desenvolvimento pós-natal do testículo – do nascimento aos três meses de idade – diminuiu significativamente o número de células de Sertoli, embora a espermatogênese e o número de células de Leydig não tenham mostrado alterações significativas (Silva Jr., 2000; Cooke et al., 2005).

Diversas metodologias com a finalidade de aumentar a produção espermática têm sido descritas. De maneira geral, as abordagens utilizadas nestas metodologias procuram promover o aumento do número de

células de Sertoli, a partir da elevação dos níveis séricos de FSH durante o período impúbere de desenvolvimento dos testículos. Dentre estas abordagens podem ser citadas a castração unilateral, a qual leva à hipertrofia compensatória do testículo remanescente (Kosco et al., 1987; Kosco et al., 1989a, b; Simorangkir et al., 1995; Thompson & Berndtson, 1993), a imunização de machos contra o estradiol (E2) (Monet-Kuntz et al., 1988), a injeção de FSH (Arslan et al., 1993; Swanlund et al., 1995; Meachem et al., 1996; Singh & Handelsman, 1996) e a inibição da pineal (Rocha et al., 1999). Da mesma forma, a administração de testosterona ou a associação do FSH com a testosterona (Arslan et al., 1993) e a associação da hemicastração com o hipotireoidismo neonatal (Simorangkir et al., 1995) promovem o aumento do peso dos testículos. No entanto, até o presente momento, o hipotireoidismo neonatal é o modelo experimental que tem demonstrado os melhores resultados para aumentar o número de células de Sertoli e a produção espermiática (Cooke et al., 1994; Cooke, 1996; Kirby et al., 1996; Miranda, 2002).

1.5. Desenvolvimento testicular nos períodos da puberdade e maturidade sexual

Nas espécies investigadas até o presente momento, considera-se que as células de Sertoli não mais se dividem após a puberdade, constituindo uma população fixa no testículo (Orth, 1982; França et al., 2000). Porém, em ratos, é comum observar aumento do peso testicular após esta fase (Ekwall et al., 1984; Berndtson & Thompson, 1990; Meisami et al., 1992; Russell, 1992), mesmo havendo estabilização do diâmetro tubular (Ekwall, 1984). Também em suínos, apesar da eficiência espermatogênica (produção espermiática diária por grama de testículo) se manter estável após a maturidade sexual (Swierstra, 1973; França, 1987; Castro et al., 1991; França et al., 2000), o comprimento total de túbulos seminíferos e a produção espermiática diária por testículo continuam a aumentar (Swierstra, 1973; Castro et al., 1991; França, 1991). Aliás, nesta última espécie, o peso testicular aumenta até pelo menos quatro anos de idade (Podany, 1969; Swierstra, 1973).

Considerando que em macacos e suínos o epitélio da região terminal dos túbulos

seminíferos, na transição com a rede testicular, é constituído principalmente por aglomerado de células de Sertoli e algumas espermatogônias (Dym, 1974; Osman & Ploen, 1978), é lógico especular que o aumento em comprimento dos túbulos seminíferos ocorra em decorrência da proliferação das espermatogônias em direção à rede testicular, sendo responsável pelos aumentos observados no peso testicular e na produção espermiática em animais adultos jovens. De certa forma, o raciocínio acima sugerido encontra suporte em camundongos transplantados com células germinativas, nos quais as espermatogônias proliferam cerca de 70 µm por dia ao longo do túbulo seminífero, alguns meses após o transplante (Nagano et al., 1999). Outra hipótese a ser considerada é a possibilidade das células de Sertoli na região de transição proliferarem por um período mais longo.

1.6. Leptina e sua importância na reprodução

O hormônio peptídico leptina, produzido principalmente pelo tecido adiposo, apresenta importante função na reprodução de machos e de fêmeas, uma vez que níveis fisiológicos deste hormônio são fundamentais para uma adequada coordenação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Caprio et al., 2001; Smith et al., 2002; Ahima et al., 2004).

Este hormônio, que é um polipeptídeo de 145 aminoácidos e peso molecular de cerca de 16 KD, foi descoberto em 1994 (Zhang et al., 1994; McGregor et al., 1996). A leptina é produzida de maneira pulsátil, principalmente pelo tecido adiposo, sendo também secretada pelo estômago (Bado et al., 1998), placenta (Henson & Castracane, 2006), tecido muscular esquelético, hipotálamo, hipófise, fígado, ovário (Muoio et al., 2002) e testículo (Aquila et al., 2005). A meia vida da leptina plasmática é de cerca de 30 minutos, sendo o gene *ob* (gene *lep*) responsável por sua transcrição regulado por glicocorticóides e TNF α , dentre outros fatores (He et al., 1995; Gong et al., 1996; Muoio et al., 2002; Ahima et al., 2004; Zieba et al., 2005).

O receptor da leptina (Ob-R) pertence à superfamília de receptores de citocinas de classe I, que inclui os receptores para IL-6, LIF (Leukemia Inhibitory Factor), oncostatina M, CNF (Ciliary Neurotrophic Factor), GH e prolactina, dentre outros (Tartaglia et al., 1995; Bahrenberg et al., 2002). Este receptor é

expresso em seis isoformas, denominadas de *a* a *f* (Tartaglia et al., 1995; Ahima et al., 2004). A isoforma *b* (Ob-Rb), que é a forma com maior atividade biológica, é fortemente expressa em neurônios do núcleo arqueado e do núcleo ventromedial do hipotálamo (Magni et al., 1999; Caprio et al., 1999; Sone et al., 2001). Também já foi demonstrada a expressão de Ob-Rb em gonadotrofos localizados na adeno-hipófise (Magni et al., 1999; Sone et al., 2001), células de Leydig (Caprio et al., 1999; Caprio et al., 2003) e células germinativas masculinas (El-Hefnawy, 2000; Ando et al., 2005; Aquila et al., 2005). Os espermatozoides em particular não só possuem receptores Ob-R como também secretam leptina (Aquila et al., 2005; Ando et al., 2005). Além disto, a leptina atravessa a barreira de célula de Sertoli (hemato-testicular) por um processo passivo não saturável (Banks et al., 1999) e também atravessa a barreira hemato-encefálica, por um processo saturável e ainda pouco conhecido (Banks et al., 1996; Bjorbaek et al., 2004). A isoforma *f* do receptor (Ob-Rf) é solúvel no plasma e atua como um transportador para a leptina (Lahlou et al., 2000).

A importância da leptina no sistema reprodutor é facilmente exemplificada nos camundongos que não possuem o gene da leptina (animais *ob/ob*) e que são obesos, hiperfágicos, diabéticos e inférteis (Jones et al., 1957; Swerdloff et al., 1976). A análise testicular destes animais que não possuem leptina endógena revela sérias alterações no processo espermato gênico, com aumento na expressão de genes pró-apoptóticos e conseqüente aumento de apoptose das células germinativas (Bhat et al., 2006). O tratamento destes animais com leptina exógena não só diminui seu peso corporal e valores glicêmicos, como também restaura sua capacidade reprodutiva (Mounzih et al., 1997).

Apesar de apresentar importante papel na fisiologia da reprodução, os mecanismos de ação da leptina no sistema genital são ainda pouco conhecidos, particularmente no sistema reprodutor masculino (Tena-Sempere et al., 2002). No entanto, de maneira geral, considera-se que a modulação neuroendócrina é o principal eixo de atuação da leptina na reprodução. Em ratos e camundongos machos, a administração de leptina resulta em aumento na secreção de LH e de FSH (Barash et al., 1996; Tena-Sempere et al., 2002). Diversos estudos

têm demonstrado que uma das possíveis ações da leptina no sistema reprodutor de roedores machos, pelo menos *in vitro*, consiste na inibição da esteroidogênese, em especial da testosterona (Tena-Sempere et al., 1999; Tena-Sempere et al., 2001).

A leptina tem sido classicamente estudada por ser um importante modulador metabólico, inibindo particularmente a ingestão calórica (Zhang et al., 1994; Ahima et al., 2004; Zieba et al., 2005). Entretanto, importantes funções desta substância na reprodução têm sido recentemente descritas na literatura fazendo com que este campo de estudo represente atualmente uma das mais promissoras áreas de investigação na reprodução animal (Ahima et al., 2004; Zieba et al., 2005; Henson & Castracane, 2006).

1.7. Referências bibliográficas

AHIMA, R.S.; OSEI, S.Y. Leptin signaling. *Physiology and Behavior*, v.81, n.2, p.223-241, 2004.

ALLAN, C.M.; GARCIA, A.; SPALIVIERO, J. et al. Complete Sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinology*, v.145, n.4, p.1587-1593, 2004.

ALMIRON, I.; CHEMES, H. Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. *International Journal of Andrology*, v.11, n.3, p.235-246, 1988.

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*, v.57, Suppl 2, p.380-403, 1983.

ANDO, S.; AQUILA, S. Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.245, n.1-2, p.1-6, 2005.

ANTONY, F.F.; ARULDHAS, M.M.; UDHAYAKUMAR, R.C. et al. Inhibition of Leydig cell activity in vivo and in vitro in hypothyroid rats. *Journal of Endocrinology*, v.144, n.2, p.293-300, 1995.

- AQUILA, S.; GENTILE, M.; MIDDEA, E. et al. Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.90, n.8, p.4753-4761, 2005.
- ARSLAN, M.; WEINBAUER, G.F.; SCHLATT, S. et al. FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase the number of spermatogonia and Sertoli cells in a juvenile non-human primate (*Macaca mulatta*). *Journal of Endocrinology*, v.136, n.2, p.235-243, 1993.
- BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S. et al. The stomach is a source of leptin. *Nature*, v.394, n.6695, p.790-793, 1998.
- BAHRENBURG, G.; BEHRMANN, I.; BARTHEL, A. et al. Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Molecular Endocrinology*, v.16, n.4, p.859-872, 2002.
- BANKS, W.A.; KASTIN, A.J.; HUANG, W. et al. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, v.17, n.2, p.305-311, 1996.
- BANKS, W.A.; MCLAY, R.N.; KASTIN, A.J. et al. Passage of leptin across the blood-testis barrier. *American Journal of Physiology*, v.276, n.6 Pt 1, p.E1099-1104, 1999.
- BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S. et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, v.137, n.7, p.3144-3147, 1996.
- BASCOM, K.F.; OSTERUD, H.L. Quantitative studies of the testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. *Anatomical Record*, v.31, p.159-169, 1925.
- BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*, v.44, n.5, p.818-833, 1977.
- BERNDTSON, W.E.; IGBOELI, G.; PICKETT, B.W. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *Journal of Animal Science*, v.64, n.1, p.241-246, 1987.
- BERNDTSON, W.E.; THOMPSON, T.L. Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *Journal of Andrology*, v.11, n.5, p.429-435, 1990.
- BEUMER, T.L.; KIYOKAWA, H.; ROEPERS-GAJADIEN, H.L. et al. Regulatory role of p27kip1 in the mouse and human testis. *Endocrinology*, v.140, n.4, p.1834-1840, 1999.
- BHAT, G.K.; SEA, T.L.; OLATINWO, M.O. et al. Influence of a leptin deficiency on testicular morphology, germ cell apoptosis, and expression levels of apoptosis-related genes in the mouse. *Journal of Andrology*, v.27, n.2, p.302-310, 2006.
- BJORBAEK, C.; KAHN, B.B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Progress in Hormone Research*, v.59, p.305-331, 2004.
- BORTOLUSSI, M.; ZANCHETTA, R.; BELVEDERE, P. et al. Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotropin receptors in rat testis from birth to puberty. *Cell and Tissue Research*, v.260, n.1, p.185-191, 1990.
- BUNICK, D.; KIRBY, J.; HESS, R.A. et al. Developmental expression of testis messenger ribonucleic acids in the rat following propylthiouracil-induced neonatal hypothyroidism. *Biology of Reproduction*, v.51, n.4, p.706-713, 1994.
- BUZZARD, J.J.; MORRISON, J.R.; O'BRYAN, M.K. et al. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of Reproduction*, v.62, n.3, p.664-669, 2000.
- CANALE, D.; AGOSTINI, M.; GIORGILLI, G. et al. Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. *Journal of Andrology*, v.22, n.2, p.284-288, 2001.
- CAPEL, B. Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annual Review of Physiology*, v.60, p.497-523, 1998.

- CAPPEL, B. The battle of the sexes. *Mechanisms of Development*, v.92, n.1, p.89-103, 2000.
- CAPRIO, M.; FABBRINI, E.; ISIDORI, A.M. et al. Leptin in reproduction. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, v.12, n.2, p.65-72, 2001.
- CAPRIO, M.; FABBRINI, E.; RICCI, G. et al. Ontogenesis of leptin receptor in rat Leydig cells. *Biology of Reproduction*, v.68, n.4, p.1199-1207, 2003.
- CAPRIO, M.; ISIDORI, A.M.; CARTA, A.R. et al. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology*, v.140, n.11, p.4939-4947, 1999.
- CARREAU, S.; GENISSEL, C.; BILINSKA, B. et al. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *International Journal of Andrology*, v.22, n.4, p.211-223, 1999.
- CASTRO, A.C.S.; CARDOSO, F.M.; FRANÇA, L.R. Effects of puberty and sexual development on daily sperm production and epididymal sperm reserves on Piau boars. *Animal Reproduction Science*, v.25, p.83-90, 1991.
- CHENG, C.Y.; MRUK, D.D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological Reviews*, v.82, n.4, p.825-874, 2002.
- CHOWDHURY, M.; STEINBERGER, E. Pituitary and plasma levels of gonadotrophins in foetal and newborn male and female rats. *Journal of Endocrinology*, v.69, n.3, p.381-384, 1976.
- CLERMONT, Y.; PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *American Journal of Anatomy*, v.100, n.2, p.241-267, 1957.
- COOKE, P.S. Thyroid hormones and testis development: a model system for increasing testis growth and sperm production. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.637, p.122-132, 1991.
- COOKE, P.S. Role of thyroid hormone in Sertoli cell mitogenesis and differentiation. *Molecular Andrology*, v.7, p.177-189, 1995.
- COOKE, P.S. Thyroid hormone and the regulation of testicular development. *Animal Reproduction Science*, v.42, n.1-4, p.333-341, 1996.
- COOKE, P.S.; HESS, R.A.; KIRBY, J.D. A model system for increasing testis size and sperm production: potential application to animal science. *Journal of Animal Science*, v.72, n.43-54, 1994.
- COOKE, P.S.; HOLSBERGER, D.R.; FRANÇA, L.R. Thyroid hormone regulation of Sertoli cell development. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. (Ed.). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.217-226.
- COOKE, P.S.; KIRBY, J.D.; PORCELLI, J. Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment: optimization of the propylthiouracil dose and effects of methimazole. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.97, n.2, p.493-499, 1993.
- COOKE, P.S.; MEISAMI, E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology*, v.129, n.1, p.237-243, 1991.
- COOKE, P.S.; PORCELLI, J.; HESS, R.A. Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biology of Reproduction*, v.46, n.1, p.146-154, 1992.
- COUROT, M.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (Ed.). *The testis*. New York, CL: Academic Press, 1970. v.1, p.339-432.
- DE KRETZER, D.M.; LOVELAND, K.L.; MEEHAN, T. et al. Inhibins, activins and follistatin: actions on the testis. *Molecular and*

- Cellular Endocrinology*, v.180, n.1-2, p.87-92, 2001.
- DE KRETZER, D.M.; MCFARLANE, J.R. Inhibin in the male. *Journal of Andrology*, v.17, n.3, p.179-182, 1996.
- DOBRINSKI, I.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R. et al. Effect of the GnRH-agonist leuprolide on colonization of recipient testes by donor spermatogonial stem cells after transplantation in mice. *Tissue and Cell*, v.33, n.2, p.200-207, 2001.
- DORRINGTON, J.H.; VERNON, R.G.; FRITZ, I.B. The effect of gonadotrophins on the 3',5'-AMP levels of seminiferous tubules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.46, n.4, p.1523-1528, 1972.
- DYM, M. The fine structure of monkey Sertoli cells in the transitional zone at the junction of the seminiferous tubules with the tubuli recti. *American Journal of Anatomy*, v.140, n.1, p.1-25, 1974.
- DYM, M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocrine Reviews*, v.15, n.1, p.102-115, 1994.
- EKWALL, H.; JANSSON, A.; SJOBORG, P. et al. Differentiation of the rat testis between 20 and 120 days of age. *Archives of Andrology*, v.13, n.1, p.27-36, 1984.
- EL-HEFNAWY, T.; IOFFE, S.; DYM, M. Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. *Endocrinology*, v.141, n.7, p.2624-2630, 2000.
- FERO, M.L.; RIVKIN, M.; TASCH, M. et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*, v.85, n.5, p.733-744, 1996.
- FRANÇA, L.R. Desenvolvimento testicular de suínos da raça Piau, do nascimento aos 12 meses de idade. *Dissertação (Mestrado)*, Belo Horizonte, UFMG – Instituto de Ciências Biológicas, 1987. 78p.
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. *Tese (Doutorado)*, Belo Horizonte, UFMG – Instituto de Ciências Biológicas, 1991. 185p.
- FRANCA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.300-318, 2005.
- FRANCA, L.R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B., (Ed.). *A Célula: Uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Ed. Manole, 2005. v.01, p.302-324.
- FRANÇA, L.R.; HESS, R.A.; COOKE, P.S. et al. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anatomical Record*, v.242, n.1, p.57-69, 1995.
- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTÍNEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. España: Churchill Communications Europe España, 1998. p.197-219.
- FRANÇA, L.R.; SILVA JR., V.A.; CHIARINI-GARCIA, H. et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, v.63, n.6, p.1629-1636, 2000.
- GONG, D.W.; BI, S.; PRATLEY, R.E. et al. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *Journal of Biological Chemistry*, v.271, n.8, p.3971-3974, 1996.
- GRISWOLD, M.D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biology of Reproduction*, v.52, n.2, p.211-216, 1995.
- GUERRA, M.O. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. *Revista Brasileira de Biologia*, v.43, n.4, p.385-394, 1983.
- HALMOS, G.; SCHALLY, A.V.; PINSKI, J. et al. Down-regulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist Cetrorelix.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.93, n.6, p.2398-2402, 1996.

HARDY, M.P.; KIRBY, J.D.; HESS, R.A. et al. Leydig cells increase their numbers but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism. *Endocrinology*, v.132, n.6, p.2417-2420, 1993.

HARDY, M.P.; SHARMA, R.S.; ARAMBEPOLA, N.K. et al. Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat. *Journal of Andrology*, v.17, n.3, p.231-238, 1996.

HE, Y.; CHEN, H.; QUON, M.J. et al. The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *Journal of Biological Chemistry*, v.270, n.48, p.28887-28891, 1995.

HENSON, M.C.; CASTRACANE, V.D. Leptin in pregnancy: an update. *Biology of Reproduction*, v.74, n.2, p.218-229, 2006.

HESS, R.A. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Reviews of Reproduction*, v.5, n.2, p.84-92, 2000.

HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D. et al. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology*, v.132, n.6, p.2607-2613, 1993.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; MONET-KUNTZ, C.; COURROT, M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.34, p.101-114, 1987.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; COURROT, M. Sertoli cells and development of seminiferous epithelium. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, v.18, p.573-583, 1978.

HODIN, R.A.; LAZAR, M.A.; WINTMAN, B.I. et al. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science*, v.244, n.4900, p.76-79, 1989.

HOLSBERGER, D.R.; BUCHOLD, G.M.; LEAL, M.C. et al. Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biology of Reproduction*, v.72, n.6, p.1429-1436, 2005.

HOLSBERGER, D.R.; COOKE, P.S. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell and Tissue Research*, v.322, n.1, p.133-140, 2005.

HOLSBERGER, D.R.; JIRAWATNOTAI, S.; KIYOKAWA, H. et al. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology*, v.144, n.9, p.3732-3738, 2003.

HOLSBERGER, D.R.; KIESEWETTER, S.E.; COOKE, P.S. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha1. *Biology of Reproduction*, v.73, n.3, p.396-403, 2005.

HUGHES, I.A. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology*, v.142, n.8, p.3281-3287, 2001.

ILIO, K.Y.; HESS, R.A. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microscopy Research and Technique*, v.29, n.6, p.432-467, 1994.

JANNINI, E.A.; CRESCENZI, A.; RUCCI, N. et al. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.85, n.9, p.3453-3457, 2000.

JANNINI, E.A.; DOLCI, S.; ULISSE, S. et al. Developmental regulation of the thyroid hormone receptor alpha 1 mRNA expression in the rat testis. *Molecular Endocrinology*, v.8, n.1, p.89-96, 1994.

JANNINI, E.A.; ULISSE, S.; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocrine Reviews*, v.16, n.4, p.443-459, 1995.

JEGOU, B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *International Review of Cytology*, v.147, p.25-96, 1993.

JOHNSON, L.; CARTER, G.K.; VARNER, D.D. et al. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.100, n.1, p.315-321, 1994.

JOHNSTON, H.; BAKER, P.J.; ABEL, M. et al. Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology*, v.145, n.1, p.318-329, 2004.

JONES, N.; HARRISON, G.A. Genetically determined obesity and sterility in the mouse. *Proceedings of the Society for the Study of Fertility*, v.9, p.51-64, 1957.

JOYCE, K.L.; PORCELLI, J.; COOKE, P.S. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *Journal of Andrology*, v.14, n.6, p.448-455, 1993.

KANGASNIEMI, M.; KAIPIA, A.; MALI, P. et al. Modulation of basal and FSH-dependent cyclic AMP production in rat seminiferous tubules staged by an improved transillumination technique. *Anatomical Record*, v.227, n.1, p.62-76, 1990.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, v.203, n.2, p.323-333, 1998.

KETELSLEGGERS, J.M.; HETZEL, W.D.; SHERINS, R.J. et al. Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinology*, v.103, n.1, p.212-222, 1978.

KIRBY, J.D.; JETTON, A.E.; COOKE, P.S. et al. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. *Endocrinology*, v.131, n.2, p.559-565, 1992.

KIRBY, J.D.; MANKAR, M.V.; HARDESTY, D. et al. Effects of transient prepubertal 6-N-propyl-2-thiouracil treatment on testis

development and function in the domestic fowl. *Biology of Reproduction*, v.55, n.4, p.910-916, 1996.

KIYOKAWA, H.; KINEMAN, R.D.; MANOVA-TODOROVA, K.O. et al. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27 (Kip1). *Cell*, v.85, n.5, p.721-732, 1996.

KLINEFELTER, G.R.; HESS, R.A. Toxicologie of excurrent ducts and accessory sex glands. In: KORACH, K.S. (Ed.). *Reproductive and developmental toxicology*. New York, CL: Marcel Dekker, 1998. p.556-591.

KOSCO, M.S.; BOLT, D.J.; WHEATON, J.E. et al. Endocrine responses in relation to compensatory testicular growth after neonatal hemicastration in boars. *Biology of Reproduction*, v.36, n.5, p.1177-1185, 1987.

KOSCO, M.S.; LOSETH, K.J.; CRABO, B.G. Development of the seminiferous tubules after neonatal hemicastration in the boar. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.87, n.1, p.1-11, 1989.

KOSCO, M.S.; LOSETH, K.J.; CRABO, B.G. Development of the testicular interstitium after neonatal hemicastration in the boar. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.87, n.1, p.13-21, 1989.

LAHLOU, N.; CLEMENT, K.; CAREL, J.C. et al. Soluble leptin receptor in serum of subjects with complete resistance to leptin: relation to fat mass. *Diabetes*, v.49, n.8, p.1347-1352, 2000.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definitions of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.55, p.548-573, 1952.

LOVELAND, K.L.; ROBERTSON, D.M. Transforming growth factor B superfamily. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. (Ed.). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.227-247.

MAGNI, P.; VETTOR, R.; PAGANO, C. et al. Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting

- neurons. *Endocrinology*, v.140, n.4, p.1581-1585, 1999.
- MALI, P.; VIRTANEN, I.; PARVINEN, M. Vimentin expression in spermatogenic and Sertoli cells is stage-related in rat seminiferous epithelium. *Andrologia*, v.19, n.6, p.644-653, 1987.
- MATTA, S.L.; VILELA, D.A.; GODINHO, H.P. et al. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology*, v.143, n.3, p.970-978, 2002.
- MCGREGOR, G.P.; DESAGA, J.F.; EHLENZ, K. et al. Radiomunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetic human subjects. *Endocrinology*, v.137, n.4, p.1501-1504, 1996.
- MEACHEM, S.J.; MCLACHLAN, R.I.; DE KRETZER, D.M. et al. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biology of Reproduction*, v.54, n.1, p.36-44, 1996.
- MEISAMI, E.; SENDERA, T.J.; CLAY, L.B. Paradoxical hypertrophy and plasticity of the testis in rats recovering from early thyroid deficiency: a growth study including effects of age and duration of hypothyroidism. *Journal of Endocrinology*, v.135, n.3, p.495-505, 1992.
- MEISTRICH, M.; WILSON, G.; SHUTTLESWORTH, G. et al. GnRH agonists and antagonists stimulate recovery of fertility in irradiated LBNF1 rats. *Journal of Andrology*, v.22, n.5, p.809-817, 2001.
- MEISTRICH, M.L.; KANGASNIEMI, M. Hormone treatment after irradiation stimulates recovery of rat spermatogenesis from surviving spermatogonia. *Journal of Andrology*, v.18, n.1, p.80-87, 1997.
- MENDIS-HANDAGAMA, S.M.; ARIYARATNE, S. Prolonged and transient neonatal hypothyroidism on Leydig cell differentiation in the postnatal rat testis. *Archives of Andrology*, v.50, n.5, p.347-357, 2004.
- MENDIS-HANDAGAMA, S.M.; ARIYARATNE, H.B.; TEUNISSEN VAN MANEN, K.R. et al. Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biology of Reproduction*, v.59, n.2, p.351-357, 1998.
- MERCHANT-LARIOS, H.; MORENO-MENDOZA, N. Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Experimental Cell Research*, v.244, n.1, p.230-238, 1998.
- MIRANDA, J.R. Efeitos do tratamento neonatal com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) e FSH na proliferação das células de Sertoli e função testicular em ratos Wistar adultos. *Dissertação (Mestrado)*, Belo Horizonte, UFMG - Escola de Veterinária, 2002. 47p.
- MITIC, L.L.; VAN ITALLIE, C.M.; ANDERSON, J.M. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology*, v.279, n.2, p.G250-254, 2000.
- MONET-KUNTZ, C.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; PISSELET, C. et al. Endocrine parameters, hormone receptors, and functions of the testicular interstitium and seminiferous epithelium in estradiol-immunized Ile-de-France rams. *Journal of Andrology*, v.9, n.4, p.278-283, 1988.
- MOROI, S.; SAITOU, M.; FUJIMOTO, K. et al. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *American Journal of Physiology*, v.274, n.6, p.C1708-1717, 1998.
- MOUNZIH, K.; LU, R.; CHEHAB, F.F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology*, v.138, n.3, p.1190-1193, 1997.
- MULHOLLAND, D.J.; DEDHAR, S.; VOGL, A.W. Rat seminiferous epithelium contains a unique junction (Ectoplasmic specialization) with signaling properties both of cell/cell and

- cell/matrix junctions. *Biology of Reproduction*, v.64, n.1, p.396-407, 2001.
- MUOIO, D.M.; LYNIS DOHM, G. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Practice Research Clinical Endocrinology Metabolism*, v.16, n.4, p.653-666, 2002.
- NAGANO, M.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biology of Reproduction*, v.60, n.6, p.1429-1436, 1999.
- NAKAYAMA, K.; ISHIDA, N.; SHIRANE, M. et al. Mice lacking p27 (Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, v.85, n.5, p.707-720, 1996.
- OGAWA, T.; DOBRINSKI, I.; AVARBOCK, M.R. et al. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, enhances colonization after spermatogonial transplantation into mouse testes. *Tissue and Cell*, v.30, n.5, p.583-588, 1998.
- ORTAVANT, R.; COURROT, M.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. (Ed.). *Reproduction in domestic animals*. New York, CL: Academic Press, 1977. p.203-227.
- ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anatomical Record*, v.203, n.4, p.485-492, 1982.
- ORTH, J.M. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*, v.115, n.4, p.1248-1255, 1984.
- ORTH, J.M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: DESJARDINS, C.; EWING, L.L., (Ed.). *Cell and molecular biology of the testis*. New York, CL: Oxford University Press, 1993. p.3-42.
- ORTH, J.M.; BOEHM, R. Functional coupling of neonatal rat Sertoli cells and gonocytes in coculture. *Endocrinology*, v.127, n.6, p.2812-2820, 1990.
- ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v.122, n.3, p.787-794, 1988.
- ORTH, J.M.; JESTER, W.F., JR. NCAM mediates adhesion between gonocytes and Sertoli cells in cocultures from testes of neonatal rats. *Journal of Andrology*, v.16, n.5, p.389-399, 1995.
- OSMAN, D.I.; PLOEN, L. The mammalian tubuli recti: ultrastructural study. *Anatomical Record*, v.192, n.1, p.1-17, 1978.
- PALMERO, S.; DE MARCO, P.; FUGASSA, E. Thyroid hormone receptor beta mRNA expression in Sertoli cells isolated from prepubertal testis. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.14, n.1, p.131-134, 1995.
- PARREIRA, G.G.; MELO, R.C.; RUSSELL, L.D. Relationship of Sertoli-Sertoli tight junctions to ectoplasmic specialization in conventional and en face views. *Biology of Reproduction*, v.67, n.4, p.1232-1241, 2002.
- PELLINIEMI, L.J.; FROJDMAN, K.; PARANKO, J. Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (Ed.). *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press, 1993. p.87-113.
- PESCOVITZ, O.H.; SRIVASTANA, S.H.; BREYER, P.R. et al. Paracrine control of spermatogenesis. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, v.5, p.126-131, 1994.
- PODANY, J. Testicular biometry in boars. *Acta Veterinaria (Belgrade)*, v.38, p.215-221, 1969.
- RAMASWAMY, S.; PLANT, T.M.; MARSHALL, G.R. Pulsatile stimulation with recombinant single chain human luteinizing hormone elicits precocious sertoli cell proliferation in the juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Biology of Reproduction*, v.63, n.1, p.82-88, 2000.

- ROCHA, D.C.; DEBELJUK, L.; FRANCA, L.R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. *Tissue and Cell*, v.31, n.3, p.372-379, 1999.
- ROOSEN-RUNGE, E.C.; GIESEL, L.O., JR. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *American Journal of Anatomy*, v.87, n.1, p.1-30, 1950.
- RUSSELL, L.D. Normal development of the testis. In: MOHR, U.; DUNGWORTH, D.L.; CAPEN, C.C. (Ed.). *Pathobiology of the aging rat*. Washington: ILSI Press, 1992. v.1, p.395-405.
- RUSSELL, L.D.; BARTKE, A.; GOH, J.C. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *American Journal of Anatomy*, v.184, n.3, p.179-189, 1989.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P. et al. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. 1. Clearwater, Fla.: Cache River Press, 1990. 286p.
- RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. *The Sertoli cell*. Clearwater: Cache River Press, 1993. 801p.
- RUSSELL, L.D.; SINHA HIKIM, A.P.; GHOSH, S. et al. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE, A. (Ed.). *Function of somatic cells in the testis*. New York, CL: Springer-Verlag, 1994. p.55-84.
- SCHLATT, S.; ARSLAN, M.; WEINBAUER, G.F. et al. Endocrine control of testicular somatic and premeiotic germ cell development in the immature testis of the primate *Macaca mulatta*. *European Journal Endocrinology*, v.133, n.2, p.235-247, 1995.
- SCHLATT, S.; MEINHARDT, A.; NIESCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal Endocrinology*, v.137, n.2, p.107-117, 1997.
- SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Ed.). *Reproduction in domestic animals*. San Diego, CL: Academic Press, 1991. p.221-249.
- SETCHELL, B.P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Ed.). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1994. p.1063-1175.
- SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Ed.). *The physiology of reproduction*. 2. New York: Raven Press, 1994. v.1, p.1363-1434.
- SHARPE, R.M.; TURNER, K.J.; MCKINNELL, C. et al. Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: effect of experimental manipulation of Sertoli cell number. *Journal of Andrology*, v.20, n.1, p.94-101, 1999.
- SHETTY, G.; WILSON, G.; HUHTANIEMI, I. et al. Gonadotropin-releasing hormone analogs stimulate and testosterone inhibits the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. *Endocrinology*, v.141, n.5, p.1735-1745, 2000.
- SHUTTLESWORTH, G.A.; DE ROOIJ, D.G.; HUHTANIEMI, I. et al. 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.
- SILVA JR, V.A. Efeitos da indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo pós-natal na proliferação das células de Sertoli e na função testicular em suínos. *Tese (Doutorado)*, Belo Horizonte, UFMG – Instituto de Ciências Biológicas, 2000. 191p.
- SIMORANGKIR, D.R.; DE KRETZER, D.M.; WREFORD, N.G. Increased numbers of Sertoli and germ cells in adult rat testes induced by synergistic action of transient neonatal hypothyroidism and neonatal hemicastration. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.104, n.2, p.207-213, 1995.

- SINGH, J.; HANDELSMAN, D.J. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Journal of Endocrinology*, v.151, n.1, p.37-48, 1996.
- SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*, v.12, n.1, p.45-77, 1991.
- SKINNER, M.K. Sertoli cell secreted regulatory factors. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D., (Ed.). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.107-120.
- SKINNER, M.K. Sertoli cell-somatic cell interactions. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. (Ed.). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.317-328.
- SMITH, G.D.; JACKSON, L.M.; FOSTER, D.L. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.73-86, 2002.
- SONE, M.; NAGATA, H.; TAKEKOSHI, S. et al. Expression and localization of leptin receptor in the normal rat pituitary gland. *Cell and Tissue Research*, v.305, n.3, p.351-356, 2001.
- SPITERI-GRECH, J.; NIESCHLAG, E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.98, n.1, p.1-14, 1993.
- STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biology of Reproduction*, v.4, n.1, p.84-87, 1971.
- SULTAN, C.; PARIS, F.; TEROUANNE, B. et al. Disorders linked to insufficient androgen action in male children. *Human Reproduction Update*, v.7, n.3, p.314-322, 2001.
- SWANLUND, D.J.; N'DIAYE, M.R.; LOSETH, K.J. et al. Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepubertal boars. *Biology of Reproduction*, v.53, n.4, p.749-757, 1995.
- SWERDLOFF, R.S.; BATT, R.A.; BRAY, G.A. Reproductive hormonal function in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology*, v.98, n.6, p.1359-1364, 1976.
- SWIERSTRA, E.E. Influence of breed, age, and ejaculation frequency on boars semen composition. *Canadian Journal of Animal Science*, v.53, p.43-53, 1973.
- TAN, K.A.; DE GENDT, K.; ATANASSOVA, N. et al. The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology*, v.146, n.6, p.2674-2683, 2005.
- TARTAGLIA, L.A.; DEMBSKI, M.; WENG, X. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, v.83, n.7, p.1263-1271, 1995.
- TEERDS, K.J.; DE ROOIJ, D.G.; DE JONG, F.H. et al. Development of the adult-type Leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. *Biology of Reproduction*, v.59, n.2, p.344-350, 1998.
- TENA-SEMPERE, M.; BARREIRO, M.L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.188, n.1-2, p.9-13, 2002.
- TENA-SEMPERE, M.; MANNA, P.R.; ZHANG, F.P. et al. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *Journal of Endocrinology*, v.170, n.2, p.413-423, 2001.
- TENA-SEMPERE, M.; PINILLA, L.; GONZALEZ, L.C. et al. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *Journal of Endocrinology*, v.161, n.2, p.211-218, 1999.
- THOMPSON, T.L.; BERNDTSON, W.E. Testicular weight, Sertoli cell number, daily sperm production, and sperm output of sexually mature rabbits after neonatal or prepubertal hemicastration. *Biology of Reproduction*, v.48, n.5, p.952-957, 1993.

ULISSE, S.; JANNINI, E.A.; CAROSA, E. et al. Inhibition of aromatase activity in rat Sertoli cells by thyroid hormone. *Journal of Endocrinology*, v.140, n.3, p.431-436, 1994.

ULTEE-VAN GESSEL, A.M.; TIMMERMAN, M.A.; DE JONG, F.H. Effects of treatment of neonatal rats with highly purified FSH alone and in combination with LH on testicular function and endogenous hormone levels at various ages. *Journal of Endocrinology*, v.116, n.3, p.413-420, 1988.

VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R. et al. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology*, v.131, n.3, p.1574-1576, 1992.

VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R. et al. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinology*, v.133, n.2, p.755-760, 1993.

VAN VORSTENBOSCH, C.J.; SPEK, E.; COLENBRANDER, B. et al. The ultrastructure of normal fetal and neonatal pig testis germ cells and the influence of fetal decapitation on the germ cell development. *Development*, v.99, n.4, p.553-563, 1987.

VERGOUWEN, R.P.; JACOBS, S.G.; HUISKAMP, R. et al. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, n.1, p.233-243, 1991.

WARREN, D.W.; HUHTANIEMI, I.T.; TAPANAINEN, J. et al. Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. *Endocrinology*, v.114, n.2, p.470-476, 1984.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, v.372, n.6505, p.425-432, 1994.

ZHOU, Q.; SHIMA, J.E.; NIE, R. et al. Androgen-regulated transcripts in the neonatal mouse testis as determined through microarray analysis. *Biology of Reproduction*, v.72, n.4, p.1010-1019, 2005.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. *Domestic Animal Endocrinology*, v.29, n.1, p.166-185, 2005.

2. CAPÍTULO I

EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM PROPIL-TIOURACIL (PTU), AGONISTA (LEUPROLIDE) E ANTAGONISTA (ANTIDE) DE GnRH NO DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DE RATOS WISTAR

RESUMO

O período neonatal, no qual o número final de células de Sertoli é estabelecido em ratos, é crítico para a determinação do número de espermatozoides produzidos no animal adulto. O FSH é considerado como o principal fator mitogênico para as células de Sertoli, sendo o hormônio tireoideano triiodotironina (T3) responsável pela regulação da maturação/diferenciação destas células. No entanto, o tratamento com a droga bociogênica PTU tem demonstrado que, apesar dos níveis plasmáticos de FSH permanecerem muito baixos durante o período de tratamento, o hipotireoidismo transitório no período neonatal leva ao aumento acentuado da população das células de Sertoli por testículo e da produção espermática em roedores tais como ratos, camundongos e hamsteres. Assim, o objetivo principal do presente trabalho foi o de investigar o grau de proliferação das células de Sertoli em animais hipotireóidicos nos quais a secreção de FSH estava suprimida pelo tratamento com um potente agonista/antagonista de GnRH (leuprolide) ou antagonista de GnRH (antide). Também foram investigados os efeitos do tratamento neonatal com dose única de leuprolide no desenvolvimento testicular e nos níveis plasmáticos de FSH de ratos Wistar. Os resultados encontrados durante o desenvolvimento pós-natal do testículo sugerem que o tratamento com o leuprolide de longa duração promoveu aumento inicial na proliferação das células de Sertoli, provavelmente devido à elevação inicial dos níveis de FSH. No entanto, a partir do primeiro dia de tratamento esta droga suprimiu os níveis de FSH por aproximadamente 5 semanas, o que provavelmente foi responsável pela diminuição significativa do peso testicular e do número de células de Sertoli por testículo nos ratos tratados adultos. Apesar de tanto o leuprolide quanto o antide funcionarem como antagonistas de GnRH, vários resultados morfofuncionais encontrados para o testículo de ratos adultos mostraram que estas drogas não necessariamente promovem os mesmos efeitos, particularmente em relação à função das células de Leydig e de Sertoli que parecem estar mais comprometidas nos animais tratados com antide. Desta forma, de maneira que pode ser considerada surpreendente, o tratamento com PTU+leuprolide não propiciou os resultados esperados para o peso testicular, número de células de Sertoli por testículo e produção espermática diária, que permaneceram nos mesmos patamares dos animais tratados somente com PTU. De fato, os resultados encontrados para os ratos tratados com PTU+leuprolide e sacrificados entre 30 e 43 dias de idade mostraram que nesta condição as células de Sertoli permaneceram imaturas e com capacidade proliferativa prolongada, sendo portanto capazes de proliferarem por um período de tempo maior no qual os níveis de FSH provavelmente estavam bastante elevados após ter cessado o efeito supressor do leuprolide no hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH).

PALAVRAS-CHAVE: Rato, desenvolvimento testicular, célula de Sertoli, GnRH, agonista, antagonista, hipotireoidismo

EFFECTS OF THE NEONATAL TREATMENT WITH PROPIL-TIOURACIL (PTU), GnRH AGONIST (LEUPROLIDE) AND ANTAGONIST (ANTIDE) IN WISTAR RAT TESTIS DEVELOPMENT

ABSTRACT

When indicating the number of spermatozoa produced in an adult animal, the neonatal period, in which the final number of Sertoli cells is established in rats, is key. It is believed that the main mitogenic factor of Sertoli cells is the FSH, while the thyroid hormone triiodothyronine (T3) would be responsible for the regulation of the maturation/differentiation of such cells. However, the treatment with the goitrogenic drug PTU has demonstrated that, despite the plasmatic levels of FSH remain very low during the treatment period, the transitory hypothyroidism in the neonatal period takes to a sharp increase of the Sertoli cells population per testis and sperm production in rodents such as rats, mice, and hamsters. Investigating the degree of proliferation of the Sertoli cells in hypothyroid animals, is the main objective

of the present work, in which the FSH secretion was suppressed by the treatment with a powerful GnRH agonist/antagonist (Leuprolide) or GnRH antagonist (Antide). Also, the effect of the neonatal treatment with a single dose of leuprolide in the testicular development and the plasmatic levels of FSH of Wistar rats was investigated. The results found during the postnatal development of the testis suggest that the treatment with leuprolide of long duration promoted initial increase in the proliferation of the Sertoli cells, probably due to initial rise of the FSH levels. However, from the first day of treatment, this drug suppressed the levels of FSH for almost 5 weeks, what probably was responsible for the substantial reduction of the testis weight and the number of Sertoli cells per testis in the adult rats. Although both leuprolide and antide work as GnRH antagonist, some morphofunctional results found in adult-rat testis had shown that these drugs don't necessarily promote the same effects, specially in relation to the function of the Leydig and Sertoli cells that seem to be more compromised in the animals treated with antide. Surprisingly, the treatment with PTU+leuprolide did not provide the expected results for testis weight, for Sertoli cell number per testis and daily sperm production, what remained within the same range as of those animals treated with PTU. In fact, the results found in rats treated with PTU+leuprolide and sacrificed between 30 and 43 days of age had shown that in this condition the Sertoli cells remained immature and with prolonged proliferative capacity, being therefore capable to proliferate during a longer time period in which the FSH levels were probably high after ceasing the suppressor effect of leuprolide in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH).

KEY-WORDS: Rat, testis development, Sertoli cell, GnRH, agonist, antagonist, hypothyroidism

2.1. Introdução

Os eventos iniciais que determinam a diferenciação da gônada primitiva em testículo são desencadeados pelas células de Sertoli imaturas, a partir da expressão do gene Sry no braço curto do cromossomo Y (Palmer and Burgoyne, 1991; Capel, 1998; Albrecht & Eicher, 2001). Ainda, durante o desenvolvimento fetal, ao se associarem com as células peritubulares mióides e auxiliarem na produção da membrana basal, as células de Sertoli propiciam o estabelecimento do processo espermatogênico, regulando a proliferação e o desenvolvimento das células germinativas primordiais (Orth & Jester, 1995; McLaren, 2000). No período pós-natal, as células de Sertoli são essenciais para o desenvolvimento e manutenção da espermatogênese via interações diretas com as células germinativas, bem como interações com os outros elementos somáticos do testículo (Orth et al., 1988; França & Chiarini-Garcia, 2005). Desta forma, as células de Sertoli desempenham papel fundamental na diferenciação e no desenvolvimento testiculares, e nas funções deste órgão na idade adulta.

No entanto, diferente das células germinativas que se dividem continuamente no epitélio seminífero ao longo da vida adulta, as células de Sertoli nos mamíferos apresentam período de proliferação específico, uma vez que em todas as espécies de mamíferos investigadas até o presente momento, não foram observadas células de Sertoli em divisão após a puberdade.

(Gondos and Berndtson, 1993; França and Russell, 1998; Sharpe et al., 2003). Em ratos, as células de Sertoli iniciam a fase proliferativa durante o desenvolvimento fetal. O índice de proliferação destas células decresce uniformemente após o nascimento, encerrando-se ao final da terceira semana pós-natal (Steinberger and Steinberger, 1971; Orth, 1982; Vergouwen et al., 1991). É considerado que durante a fase proliferativa pós-natal o número de células de Sertoli no testículo de ratos aumenta cerca de trinta vezes (Wang et al., 1989). O processo de diferenciação e maturação das células de Sertoli ocorre com o encerramento da fase mitótica das mesmas. Este processo é caracterizado por modificações morfológicas intensas tais como formação do citoesqueleto e de filamentos de actina relacionados com as funções específicas destas células (ex: junções de oclusão e especializações ectoplasmáticas), proliferação maciça de espermatócitos primários, produção e secreção de proteínas e diversos fatores necessários para o desenvolvimento das células germinativas e pela produção de fluido testicular que determina o surgimento do lume tubular (Gondos and Berndtson, 1993; França & Chiarini-Garcia, 2005). As células de Sertoli são também fundamentais na intermediação hormonal da regulação do processo espermatogênico, particularmente na ação dos andrógenos e FSH (França & Chiarini-Garcia, 2005).

Em relação ao período proliferativo, o FSH é considerado o principal fator mitogênico para as células de Sertoli (Orth, 1982; Almirón and Chemes, 1988; Sharpe, 1994; França & Chiarini-Garcia, 2005). Considerando que estas células apresentam capacidade de suporte relativamente fixa para células germinativas de acordo com a espécie (Russell and Peterson, 1984; Orth et al., 1988; França and Russel, 1998), o número de células de Sertoli estabelecido no período pré-púbere determina o tamanho potencial do testículo e a magnitude da produção espermiática nos animais adultos (Berndtson et al., 1987; Hochereau-De Reviers et al., 1987; Orth et al., 1988; Orth, 1993; Hess et al., 1993; Johnson et al., 1994; França and Russel, 1998; França & Chiarini-Garcia, 2005; França et al., 2005).

A redução dos níveis de hormônios tireoideanos circulantes em ratos, induzida pela droga bociogênica 6-propil-2-tiouracil (PTU) no período neonatal, prolonga a fase proliferativa das células de Sertoli até cerca de 35 dias de idade (van Haaster et al., 1992; Joyce et al., 1993). O efeito do hipotireoidismo transitório induzido pelo PTU sobre o número final de células de Sertoli só é eficiente quando o tratamento é realizado no período neonatal, fase em que as células de Sertoli dividem-se rapidamente (Cooke et al., 1992). Interessantemente, o aumento do número de células de Sertoli nestes animais ocorre mesmo diante da redução de cerca de 30-80% na concentração plasmática de FSH (Kirby et al., 1992; van Haaster et al., 1992).

Considerando a importância do número de células de Sertoli por testículo em determinar a produção espermiática, o conhecimento pleno dos fatores envolvidos na proliferação destas células torna-se crítico para se buscar explorar o potencial reprodutivo máximo de espécies de interesse econômico. Desta forma, o principal objetivo do presente experimento foi o de avaliar os efeitos da administração de drogas que alteram as concentrações plasmáticas de FSH no número de células de Sertoli e na produção espermiática diária, em ratos Wistar hipotireoídicos devido ao tratamento neonatal com PTU.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Animais

No principal experimento do presente trabalho foram utilizados 46 ratos Wistar

machos, recém-nascidos e procedentes do biotério do ICB/UFMG. Estes animais foram divididos ao acaso em seis grupos, e tratados do nascimento aos 20 dias de idade com a droga bociogênica propil tiouracil (PTU), agonista (leuprolide) e antagonista (antide) de GnRH, conforme segue:

- Grupo I – Controle (n = 8)*;
- Grupo II – PTU (n = 8);
- Grupo III – Agonista de GnRH (n = 8);
- Grupo IV – Agonista de GnRH + PTU (n = 7);
- Grupo V – Antagonista de GnRH (n = 7);
- Grupo VI – Antagonista de GnRH + PTU (n = 8);

onde n = número de animais. * Todos os animais dos seis grupos acima citados foram sacrificados aos 100 dias de idade.

Adicionalmente, com o objetivo de investigar o desenvolvimento testicular e as concentrações plasmáticas de FSH durante todo o período experimental, 97 ratos Wistar tratados com leuprolide (agonista/antagonista de GnRH) e controles foram sacrificados com 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 36 e 43 dias de idade. Nas três últimas idades (30, 36 e 43 dias) também foram avaliados animais tratados com PTU e a associação de PTU + leuprolide. O número médio de animais tratados e controles para cada idade investigada foi de 4 exceto para as seguintes idades e/ou tratamentos: dois dias (controle, n = 5; leuprolide, n = 7); três dias (controle, n = 6; leuprolide, n = 5); trinta dias (PTU, n = 7; PTU+leuprolide, n = 6); trinta e seis dias (controle, n = 5; leuprolide, n = 5; PTU, n = 6; PTU+leuprolide, n = 5); quarenta e três dias (controle, n = 4; leuprolide, n = 4; PTU e PTU+leuprolide, n = 6). Desta forma, o número total de ratos sacrificados nos experimentos acima mencionados foi de 133.

Todos os animais foram mantidos em biotério climatizado do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, com temperatura média de 22°C, umidade média de 70% e 12 horas diárias de luminosidade. Água e ração peletizada foram disponibilizadas *ad libitum* às mães ou aos ratos após o desmame.

2.2.2. Tratamentos

O PTU (6-propil-2-tiouracil, Sigma), na concentração de 0,03%, foi colocado na água de beber das mães dos animais dos grupos II, IV, VI e de grupos sacrificados aos 30, 36 e 43 dias de idade, durante os primeiros 20 dias de

idade. Com este procedimento, a droga ingerida pela mãe é transferida para os animais recém-nascidos através do leite, promovendo hipotireoidismo nestes animais (Cooke & Meisami, 1991). Com a finalidade de melhorar a palatabilidade do PTU, que tem sabor bastante amargo, foram adicionadas 10 gotas de adoçante (Adocyl) por litro de solução fornecida para as mães. O agonista de GnRH (Leuprolide acetate, TAP Pharmaceuticals Inc.) foi ministrado através de injeção subcutânea (dose única) de 0,1 mL de solução salina contendo 0,25 mg para cada animal. O acetato de leuprolide é um superagonista sintético de GnRH, utilizado no tratamento de distúrbios dependentes de hormônios sexuais, como o câncer de próstata. Esta droga apresenta uma formulação de longa duração (*depot*) que permite liberação constante da droga por longos períodos, após administração de dose única (Luan and Bodmeier, 2006). Os efeitos do tratamento prolongado com agonistas de GnRH são bifásicos: inicialmente observa-se uma fase estimulatória com elevação nos níveis plasmáticos de LH, FSH e testosterona, seguida de uma fase inibitória com redução na secreção de LH, FSH e concomitantemente testosterona (Okada et al., 1994).

O antagonista de GnRH (Antide, Bachem, CA, USA) foi ministrado através de injeções subcutâneas diárias de 0,1 mL de solução salina contendo 10 mg para cada animal/dia, de 0 a 20 dias de idade. Este antagonista atua ocupando seletiva e reversivelmente os receptores hipofisários de GnRH interferindo, assim, na habilidade do GnRH em estimular a secreção de gonadotrofinas (Prince et al., 1998). Os animais dos grupos controle, PTU e agonista de GnRH receberam 0,1 mL de solução salina 0,9% pela mesma via, durante o período de tratamento.

Os animais de cada grupo experimental permaneceram em caixas plásticas separadas, com as respectivas mães, até aproximadamente 30 dias após o nascimento, quando então se procedeu a retirada das fêmeas (desmame). A partir deste período, os mesmos permaneceram em suas caixas até a idade programada para o sacrifício, aos 100 dias de idade.

2.2.3. Colheita de material

No período planejado para o sacrifício, os animais com idade igual ou superior a 25 dias foram pesados, heparinizados (Liquemine,

Roche) (125 UI Kg/peso corporal) e anestesiados com pentobarbital sódico (Tiopental, Cristália) (5 mg/100g de peso corporal), sendo em seguida perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução salina 0,9%, por alguns minutos. Após esta etapa, os mesmos foram fixados com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,2, durante 25-30 minutos, segundo técnica citada por Sprando (1990). Em seguida, os testículos destes animais foram coletados, dissecados e pesados. Antes do sacrifício, os animais tiveram o sangue coletado e centrifugado, sendo o plasma congelado para obtenção das concentrações de FSH.

De cada animal, fragmentos transversais do testículo direito ou esquerdo com até 3 mm de espessura foram colhidos. Estes fragmentos foram imersos em glutaraldeído a 4%, no mesmo tampão, por um período de até 24 horas. Após este período, o material foi armazenado a 4°C, no mesmo tampão. Para os estudos em microscopia de luz, os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, Leica). Cortes histológicos com 4 µm de espessura foram obtidos com navalha de vidro, sendo posteriormente corados com azul de toluidina-borato de sódio a 1%.

Os animais com idade inferior a 25 dias tiveram seus testículos fixados por imersão, no mesmo fixador acima citado, sendo também processado da mesma forma para posterior análise.

2.2.4. Análises histológica e morfométrica dos testículos

O diâmetro tubular/cordonal médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos/cordões seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero e foram realizadas utilizando-se régua micrométrica adaptada a uma das oculares de 10x, em aumento de 100x e 400x. As proporções volumétricas dos diversos constituintes do parênquima testicular, tais como compartimento tubular (lume, epitélio e túnica própria) e compartimento intertubular (células de Leydig, vasos e outros), foram estimadas utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 400x. Para cada animal foram

analisados 15 campos, escolhidos ao acaso, perfazendo-se um total de 6615 pontos. O volume (mL) de cada componente testicular avaliado foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea. Em ratos adultos, considerou-se o peso da túnica albugínea como sendo 6,5% do peso bruto do testículo (Russell & França, 1995). Nos animais em desenvolvimento, o percentual ocupado pela túnica albugínea foi estimado a partir da determinação da proporção volumétrica (%) da mesma nas diferentes idades investigadas. Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,03 a 1,04; França, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

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/cordonal médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (Attal & Courot, 1963; Dorts & Sajonski, 1974):

$$CT = VTS/\pi R^2 \text{ onde,}$$

VTS é igual ao volume total dos túbulos seminíferos no testículo, e πR^2 é a área de secção transversal de túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

2.2.5. Contagem celular

A estimativa da população de espermátides arredondadas e de células de Sertoli realizada nos animais sacrificados aos 100 dias de idade foi feita a partir de contagens dos núcleos das espermátides arredondadas e de nucléolos das células de Sertoli no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (CES), classificado de acordo com o método do sistema acrossômico (Russell et al., 1990). Com o objetivo de se avaliar o número total de células de Sertoli durante o desenvolvimento testicular, para os diversos tratamentos utilizados, foi realizada a contagem de núcleos/núcléolos destas células, independentemente do estágio do ciclo do epitélio seminífero, nos animais pré-púberes com 30, 36 e 43 dias de idade. Nos animais sacrificados aos 30 dias de idade, cujas células de Sertoli apresentavam-se imaturas e sem nucléolo evidente, os valores obtidos foram corrigidos utilizando-se o diâmetro nuclear. As

contagens obtidas foram realizadas em aumento de 1000x, sendo utilizadas 10 secções transversais de túbulos seminíferos com perfis o mais arredondados possíveis, para cada animal.

Os valores obtidos para as espermátides arredondadas e células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nuclear/nucleolar e espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962).

O número total de células de Sertoli por testículo foi estimado a partir do número corrigido de nucléolos/núcleos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau-De Reviers & Lincoln (1978). A partir deste cálculo, e utilizando-se o peso líquido do testículo, foi também estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo.

Com o objetivo de se estimar a eficiência do processo espermatogênico e da célula de Sertoli nos animais sacrificados aos 100 dias de idade, foi calculada a razão entre os números corrigidos de espermátides arredondadas e de células de Sertoli, denominado índice de células de Sertoli (ICS).

A estimativa da produção espermática diária (PED) foi feita de acordo com França (1992), utilizando-se a seguinte fórmula: $PED = \text{Número total de células de Sertoli por testículo} \times \text{frequência do estágio VII (\%)} / \text{Duração do estágio VII (dias)}$, onde ICS = número de espermátides arredondadas por célula de Sertoli no estágio VII. O valor utilizado para a duração do estágio VII foi o citado por Russell et al. (1990).

O volume individual das células de Leydig nos animais sacrificados aos 100 dias de idade foi obtido a partir do volume do núcleo e da proporção entre núcleo e citoplasma. O volume do núcleo foi obtido utilizando a média do diâmetro nuclear, tendo sido avaliados 30 diâmetros nucleares para cada animal. O volume nuclear individual obtido foi expresso em (μm^3), utilizando-se a fórmula $4/3\pi R^3$, onde R = diâmetro nuclear/2. Para calcular a proporção entre núcleo e citoplasma, foi utilizado retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 1000x. Aproximadamente mil pontos sobre células de Leydig foram contados para cada animal. O

número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo foi estimado a partir do volume individual de células de Leydig e do volume ocupado pelas células de Leydig no testículo.

2.2.6. Concentrações plasmáticas de FSH

Estas avaliações foram realizadas no Departamento de Fisiologia da Escola de Medicina, Universidade do Sul de Illinois, E.U.A, através de radioimunoensaio (RIE). As concentrações plasmáticas de FSH foram obtidas por meio de RIEs de fase sólida, utilizando-se kits comerciais da ICN Farmacêutica (Costa Mesa, Califórnia, EUA). Desta forma, uma alíquota de 50µL de soro foi colocada em cada tubo de ensaio, sendo adicionado tampão contendo o traçador (40.000 cpm/tubo). Esta mistura foi incubada por 3 horas a 37°C. Após esta etapa, os tubos foram decantados e a radioatividade existente nos mesmos foi medida em contador gama acoplado a um computador, o qual calculou o valor final expressado em ng/mL de plasma para o FSH. Um único ensaio foi realizado, sendo o coeficiente de variação intra-ensaio de 4%.

2.2.7. Análises estatísticas

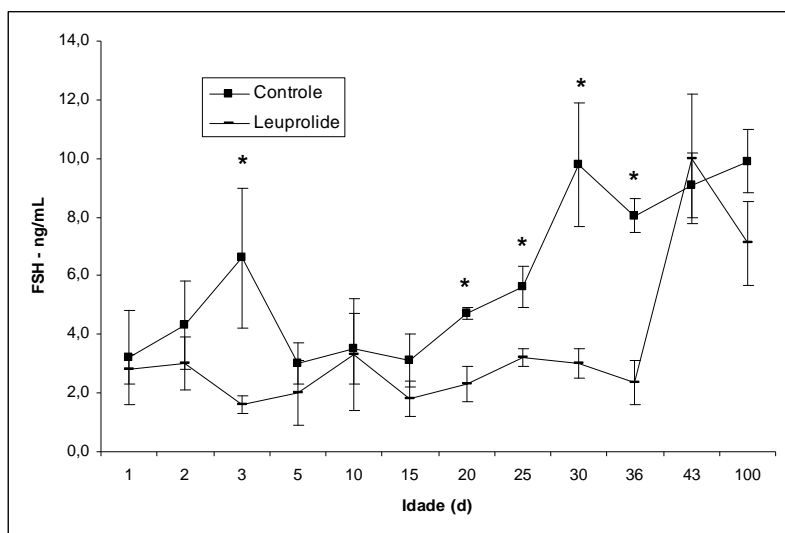
Todos os dados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média. Os valores médios obtidos para os animais sacrificados aos 30, 36, 43 e 100 dias de idade

foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste Student Newman-Keuls. Pelo fato de existirem somente dois grupos experimentais nesta etapa da investigação, os valores médios obtidos com os animais sacrificados de 0 a 25 dias de idade foram submetidos ao teste t de Student. Estes testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software STATISTICA 3.11 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA, 1995). O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

2.3. Resultados

2.3.1. Animais tratados com leuprolide e avaliados durante o período de desenvolvimento pós-natal do testículo

Os resultados encontrados para as concentrações plasmáticas de FSH durante a fase de desenvolvimento pós-natal dos testículos nos animais controles e tratados com leuprolide encontram-se na Figura 1. Conforme pode ser observado, as concentrações plasmáticas deste hormônio apresentaram-se significativamente reduzidas ($p < 0,05$) aos 3 dias de idade e no período de 20 a 36 dias de idade nos ratos tratados. Aos 43 dias de idade pôde ser notado o retorno das concentrações plasmáticas de FSH aos níveis observados para o grupo controle, permanecendo desta forma aos 100 dias de idade.

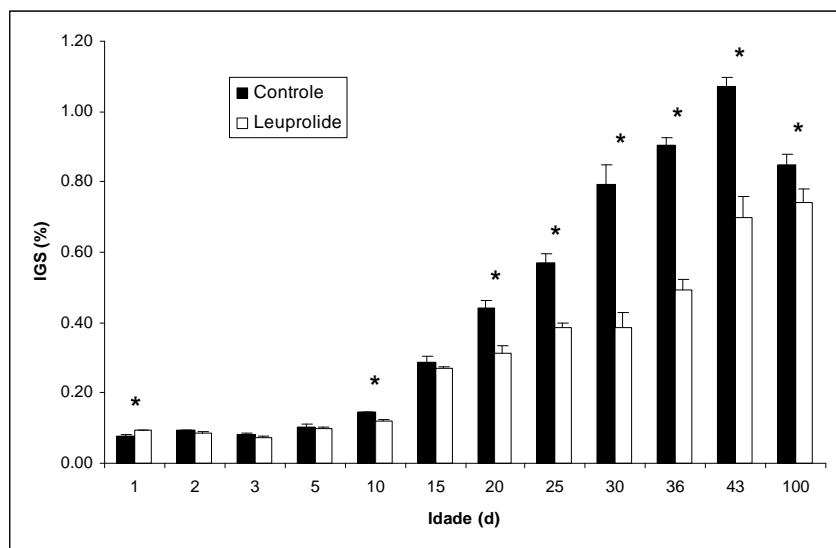


* = Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Figura 1 – Concentrações plasmáticas de FSH em ratos Wistar controles e tratados com leuprolide, em diferentes idades após o nascimento (média ± erro padrão).

A Figura 2 mostra o índice gonadossomático em ratos controles e tratados com leuprolide. Nesta figura pode ser notado que o índice gonadossomático nos animais tratados com leuprolide e sacrificados com 1 dia de idade foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. No entanto, nas idades de 2, 3 e 5 dias após o nascimento os valores encontrados para este parâmetro não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Com exceção dos 15 dias de idade, de 10 aos 100 dias de idade o índice gonadossomático foi sistematicamente menor ($p < 0,05$) nos animais tratados. É interessante observar que aos 30, 36 e 43 dias de idade, período que antecede a puberdade, os índices

gonadossomáticos nos animais tratados apresentavam redução de 51, 45 e 35%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. No entanto, apesar de ser significativamente diferente ($p < 0,05$), aos 100 dias de idade esta redução correspondia apenas a 13% dos valores obtidos para o grupo controle. Os dados referentes ao peso testicular e obtidos ao longo do desenvolvimento pós-natal dos animais controles e tratados com leuprolide seguiram exatamente a mesma tendência e significância observada para o índice gonadossomático. Por isto, os mesmos não estão discriminados.

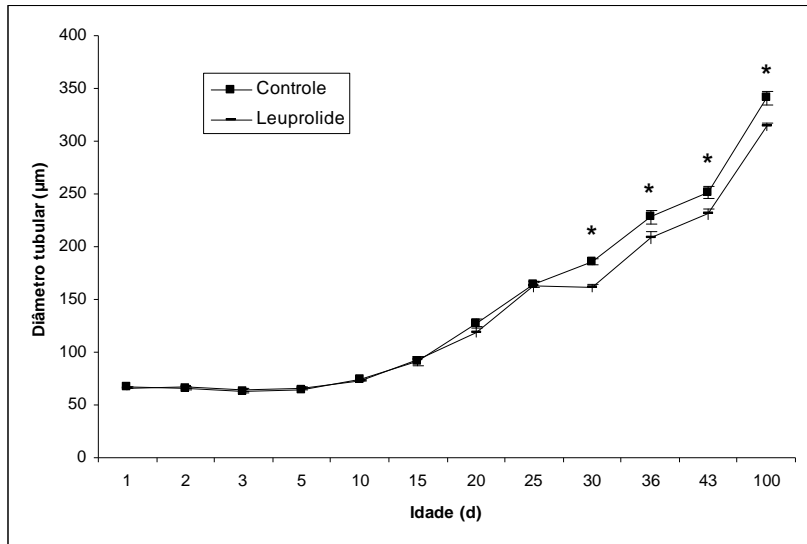


* = Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Figura 2 – Índice gonadossomático em ratos controles e tratados com leuprolide, em diferentes idades após o nascimento (média \pm erro padrão).

Conforme pode ser observado na Figura 3, a partir dos 30 dias de idade o diâmetro tubular foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos animais tratados com leuprolide, permanecendo esta tendência até a idade adulta. É importante ser mencionado que as análises histológicas não mostraram alterações evidentes nos túbulos seminíferos e no compartimento intertubular dos ratos tratados com leuprolide e avaliados durante todo o período de desenvolvimento pós-natal dos testículos. Por exemplo, o tipo de

célula germinativa mais avançado nas diferentes idades avaliadas para os dois grupos experimentais foi praticamente o mesmo e o processo de luminação dos cordões seminíferos também não mostrou alteração temporal.

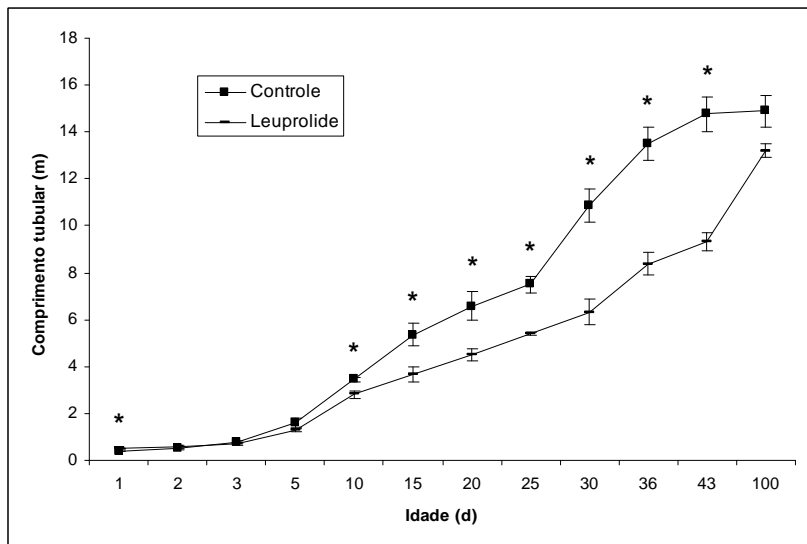


* = Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Figura 3 – Diâmetro de túbulos seminíferos em ratos controles e tratados com leuprolide, em diferentes idades após o nascimento (média \pm erro padrão).

De maneira geral, o comprimento total dos túbulos seminíferos obtido durante as diversas idades avaliadas seguiu a mesma tendência observada para o índice gonadossomático (Figura 4). Assim, com 1 dia de idade o comprimento tubular total encontrava-se significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo

tratado com leuprolide. A partir dos 10 dias de idade, o grupo controle passou a apresentar o comprimento tubular total maior do que aquele do grupo tratado ($p < 0,05$), o que não foi observado aos 100 dias de idade ($p > 0,05$).



* = Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Figura 4 – Comprimento de túbulos seminíferos em ratos controles e tratados com leuprolide, em diferentes idades após o nascimento (média \pm erro padrão).

2.3.2. Parâmetros biométricos e histometria testicular em ratos Wistar adultos

Os dados biométricos e histométricos de todos os grupos experimentais sacrificados aos 100 dias de idade estão mostrados na Tabela 1. Conforme pode ser observado nesta tabela, apesar de não diferirem entre si ($p > 0,05$) os animais tratados com PTU+leuprolide, antide e PTU+antide apresentaram o peso corporal significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Os pesos testiculares médios dos grupos experimentais tratados com leuprolide e antide apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de ~25 e ~40%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle, não havendo, entretanto, diferença significativa ($p > 0,05$) entre estes dois tratamentos. Já o grupo tratado com PTU apresentou peso testicular médio ~50% superior ($p < 0,05$) ao grupo controle, resultado bastante semelhante ao observado para o grupo tratado com PTU+leuprolide. Por outro lado, os animais tratados com PTU+antide apresentaram peso testicular similar ($p > 0,05$) aos animais do grupo controle. Conforme pode ser ainda observado na Tabela 1, todos os grupos tratados com PTU apresentaram maior índice gonadossomático ($p < 0,05$) do que o encontrado para o grupo controle, sendo o valor observado para os animais tratados com PTU+leuprolide maior ($p < 0,05$) do que aquele dos demais grupos experimentais.

Apesar de não diferirem entre si, o diâmetro tubular médio observado nos animais tratados com leuprolide e antide foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que o observado nos animais controle. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diversos tratamentos para o volume percentual ocupado pelos túbulos seminíferos no parênquima testicular. De maneira geral, o comprimento total de túbulos seminíferos apresentou a mesma tendência observada para o peso testicular.

2.3.2.1. Células de Leydig

Os parâmetros avaliados para as células de Leydig estão também apresentados na Tabela 1. Comparado com o grupo controle e os grupos experimentais tratados com antide, o percentual ocupado pelas células de Leydig no parênquima testicular apresentou-se reduzido ($p < 0,05$) nos ratos Wistar tratados com PTU+leuprolide. Em comparação com o grupo controle, o percentual

ocupado pelo núcleo da célula de Leydig apresentou-se reduzido ($p < 0,05$) nos grupos tratados com PTU, antide e PTU+antide, estando no entanto elevado ($p < 0,05$) no grupo tratado com PTU+leuprolide. Em relação ao volume nuclear, com exceção do grupo tratado com PTU, em todos os demais tratamentos os valores observados para este parâmetro estavam reduzidos ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. O volume citoplasmático apresentou-se bastante reduzido ($p < 0,05$) no grupo tratado com PTU+leuprolide, em comparação com os demais grupos experimentais. Tendência esta também observada para o volume individual das células de Leydig, que ainda se apresentou significativamente reduzido ($p < 0,05$) nos grupos tratados com antide, em comparação com os grupos controle e tratado com PTU, e leuprolide quando comparado com o grupo tratado somente com PTU. Em relação aos grupos tratados com PTU e PTU+leuprolide, os dois grupos tratados com antide promoveram aumentos significativos ($p < 0,05$) no número de células de Leydig por grama de testículo. Já os tratamentos somente com antide e PTU, promoveram respectivamente elevação ($p < 0,05$) e diminuição ($p < 0,05$) no número destas células por grama de testículo, em comparação com o grupo controle. Finalmente, com exceção do grupo tratado com PTU+antide, que foi diferente do grupo tratado com leuprolide ($p < 0,05$), os demais grupos experimentais investigados não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) entre si, no número total de células de Leydig por testículo.

Tabela 1. Dados biométricos e morfométricos de ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, em associação com leuprolide e antide, e sacrificados aos 100 dias de idade (média \pm erro-padrão).

Parâmetro	Controle (n = 8)	PTU (n = 8)	Leuprolide (n = 8)	PTU+Leuprolide (n = 7)	Antide (n = 7)	PTU+Antide (n = 8)
Peso corporal (g)	384 \pm 10 ^{a*}	326 \pm 8 ^{ac}	335 \pm 14 ^{ac}	266 \pm 17 ^b	313 \pm 18 ^{bc}	282 \pm 17 ^{bc}
Peso testicular (g)	1,63 \pm 0,05 ^a	2,48 \pm 0,11 ^b	1,23 \pm 0,02 ^c	2,49 \pm 0,05 ^b	0,98 \pm 0,04 ^c	1,70 \pm 0,08 ^a
Índice gonadossomático (%)	0,85 \pm 0,03 ^a	1,53 \pm 0,09 ^b	0,74 \pm 0,04 ^a	1,91 \pm 0,11 ^c	0,63 \pm 1,24 ^a	1,24 \pm 0,10 ^b
Diâmetro tubular (μ m)	341 \pm 6 ^a	354 \pm 6 ^a	314 \pm 4 ^{bc}	337 \pm 6 ^{ab}	305 \pm 4 ^c	341 \pm 7 ^a
Percentual de túbulos seminíferos	88,7 \pm 1,0 ^a	92,1 \pm 0,9 ^a	89,0 \pm 1,3 ^a	92,1 \pm 0,3 ^a	89,9 \pm 0,9 ^a	89,5 \pm 1,3 ^a
Volume tubular (mL)	1,35 \pm 0,05 ^a	2,17 \pm 0,11 ^b	1,02 \pm 0,02 ^c	2,14 \pm 0,04 ^b	0,82 \pm 0,04 ^c	1,38 \pm 0,05 ^a
Comprimento tubular total (m)	14,9 \pm 0,7 ^a	21,9 \pm 0,7 ^b	13,2 \pm 0,3 ^{ad}	24,2 \pm 1,0 ^c	11,3 \pm 0,6 ^d	15,7 \pm 0,9 ^a
Célula de Leydig:						
Percentual no testículo	2,84 \pm 0,26 ^a	1,91 \pm 0,24 ^{ab}	2,32 \pm 0,21 ^{ab}	1,45 \pm 0,09 ^b	2,82 \pm 0,29 ^a	2,72 \pm 0,42 ^a
Proporção de núcleo (%)	15,6 \pm 0,4 ^a	14,1 \pm 0,4 ^b	15,7 \pm 0,3 ^a	17,9 \pm 0,4 ^c	14,0 \pm 0,3 ^b	14,5 \pm 0,2 ^b
Volume nuclear (μ m ³)	189 \pm 7 ^a	175 \pm 7 ^{ac}	169 \pm 3 ^b	149 \pm 3 ^c	147 \pm 6 ^c	160 \pm 4 ^{bc}
Volume Citoplasmático (μ m ³)	1022 \pm 45 ^{ab}	1061 \pm 22 ^b	909 \pm 23 ^a	684 \pm 19 ^c	905 \pm 39 ^a	947 \pm 39 ^a
Volume individual (μ m ³)	1210 \pm 51 ^{ab}	1236 \pm 28 ^a	1078 \pm 25 ^{bc}	834 \pm 21 ^d	1052 \pm 44 ^c	1107 \pm 43 ^{abc}
Células de Leydig/g/testículo ($\times 10^6$)	24,2 \pm 2,2 ^{ad}	15,6 \pm 2,0 ^b	22,1 \pm 2,1 ^{abd}	17,4 \pm 1,0 ^{ab}	35,2 \pm 2,4 ^c	28,1 \pm 3,5 ^d
Células de Leydig/ testículo ($\times 10^6$)	36,9 \pm 3,2 ^{ab}	36,6 \pm 4,8 ^{ab}	25,6 \pm 2,5 ^a	40,3 \pm 2,2 ^{ab}	34,3 \pm 2,3 ^{ab}	45,6 \pm 6,5 ^b
Células de Sertoli/g/testículo ($\times 10^6$)	26,7 \pm 0,9 ^a	33,4 \pm 1,4 ^b	26,3 \pm 0,8 ^a	31,6 \pm 1,4 ^b	28,6 \pm 1,2 ^{ab}	31,1 \pm 2,5 ^{ab}
Células de Sertoli/testículo ($\times 10^6$)	40,6 \pm 1,8 ^a	78,7 \pm 5,7 ^b	30,3 \pm 1,6 ^c	73,4 \pm 3,4 ^b	26,5 \pm 1,4 ^c	46,8 \pm 3,9 ^a
Espermátides/célula de Sertoli	8,3 \pm 0,3 ^{ab}	7,5 \pm 0,4 ^b	9,4 \pm 0,4 ^a	8,4 \pm 0,2 ^{ab}	7,9 \pm 0,5 ^b	7,1 \pm 0,2 ^b
PED/g/testículo ($\times 10^6$)**	17,1 \pm 0,7 ^a	19,1 \pm 0,4 ^{ab}	19,1 \pm 0,8 ^{ab}	20,5 \pm 0,7 ^b	17,3 \pm 0,9 ^a	16,9 \pm 1,0 ^a
PED/testículo ($\times 10^6$)	25,9 \pm 1,3 ^a	44,7 \pm 1,8 ^b	21,8 \pm 0,7 ^a	47,6 \pm 1,7 ^b	16,1 \pm 1,0 ^c	25,3 \pm 1,5 ^a

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

** PED = Produção espermiática diária.

2.3.2.2. Células de Sertoli e produção espermiática

Os dados referentes às células de Sertoli e à produção espermiática diária encontram-se na Tabela 1. Com exceção dos grupos tratados com PTU e PTU+leuprolide, cujos valores encontrados para o número de células de Sertoli por grama de testículo foram significativamente maiores ($p < 0,05$) em comparação com os grupos controle e tratado somente com leuprolide, os demais grupos experimentais investigados foram semelhantes entre si ($p > 0,05$). Os valores obtidos para o número de células de Sertoli por testículo seguiram praticamente a mesma tendência observada para o peso testicular, volume ocupado pelos túbulos seminíferos nos testículos e comprimento total de túbulos seminíferos. Assim, os valores encontrados para este importante parâmetro foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos animais tratados com PTU e PTU+Leuprolide, quando comparados com o grupo controle. De maneira oposta, o número de células de Sertoli por testículo nos animais tratados com leuprolide e antide apresentaram-se menores ($p < 0,05$) do que o observado para o grupo controle. A eficiência das células de Sertoli (número de espermatídes arredondadas por célula de Sertoli) apresentou-se significativamente reduzida ($p < 0,05$) nos ratos tratados com PTU, antide e PTU+antide, em comparação com o grupo tratado somente com leuprolide, cuja eficiência da célula de Sertoli mostrou-se relativamente elevada. Quanto a produção espermiática diária por grama de testículo (eficiência espermatogênica), a mesma mostrou-se aumentada ($p < 0,05$) no grupo tratado com PTU+leuprolide, em comparação com os grupos controle, antide e PTU+antide. Os demais grupos foram semelhantes entre si. Já a produção espermiática diária por testículo seguiu tendência próxima da observada para o número de células de Sertoli por testículo. No entanto, ao se compararem os grupos tratados com leuprolide e antide com o grupo controle, somente no último a redução observada para a produção espermiática (~40%) foi significativa ($p < 0,05$). Vale ressaltar também que o tratamento com antide resultou em diminuição significativa ($p < 0,05$) da produção espermiática diária por testículo, em comparação com o grupo tratado somente com leuprolide.

2.3.3. Animais tratados com PTU e leuprolide e avaliados no período pré-púbere e na idade adulta

Pelo fato do tratamento com PTU+leuprolide ter propiciado vários resultados de certa forma inesperados, tais como aumento substancial do peso do testículo, do volume ocupado pelos túbulos seminíferos, do número de células de Sertoli por testículo e da produção espermiática diária, novos experimentos foram desenvolvidos em alguns períodos considerados críticos (30, 36 a 43 dias de idade) que antecedem a puberdade em ratos e após terem sido encerrados os tratamentos. Os resultados obtidos nestes experimentos foram comparados com aqueles encontrados nos animais tratados com PTU e leuprolide e previamente investigados na idade adulta. Nas Figuras de 5 à 8 pode ser visualizado o aspecto panorâmico do parênquima testicular dos ratos Wistar controles e tratados e sacrificados nas diferentes idades investigadas.

Conforme pode ser observado na Figura 9, nas idades de 30 a 43 dias, em todos os grupos tratados o peso dos testículos apresentou-se bastante reduzido ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle, particularmente nos grupos tratados com PTU. No entanto, vale ressaltar que nos animais tratados com PTU+leuprolide a recuperação do peso testicular foi menos visível aos 43 dias. Já aos 100 dias de idade, em contraste com o peso dos testículos que foi 1/4 menor ($p < 0,05$) nos ratos tratados com leuprolide, os valores encontrados para este parâmetro nos ratos tratados com PTU e PTU+leuprolide foram cerca de 50% mais elevados ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle.

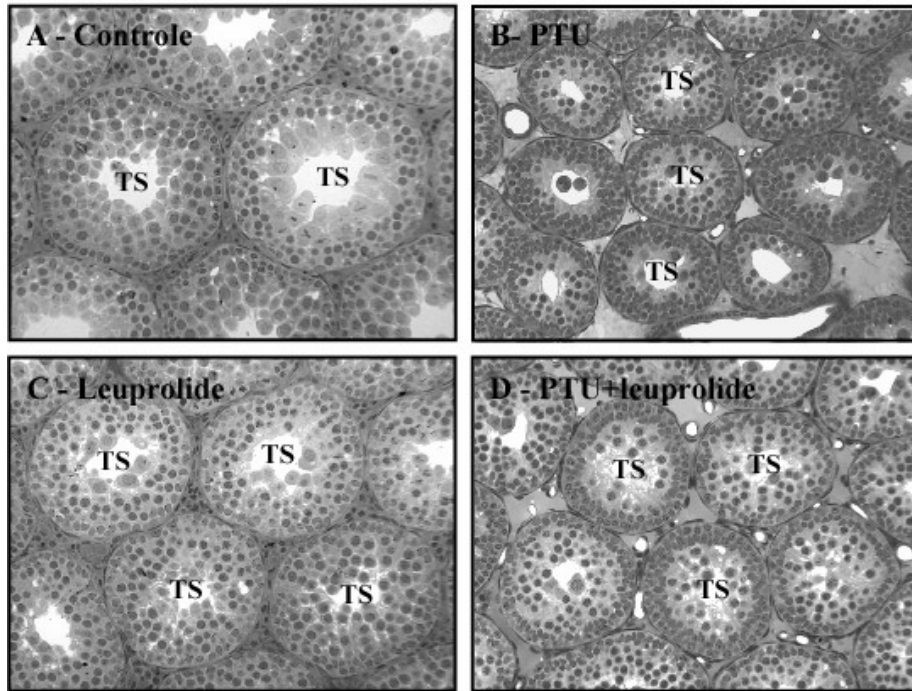


Figura 5 - Vista panorâmica do parênquima testicular dos ratos Wistar controles e tratados, sacrificados aos 30 dias de idade. Observe que, comparado ao grupo controle, os ratos tratados com PTU e PTU+leuprolide apresentam o processo espermatogênico bem mais atrasado. Este aspecto é facilmente perceptível através da observação do diâmetro tubular. TS = Túbulo seminífero. Aumento = 160x.

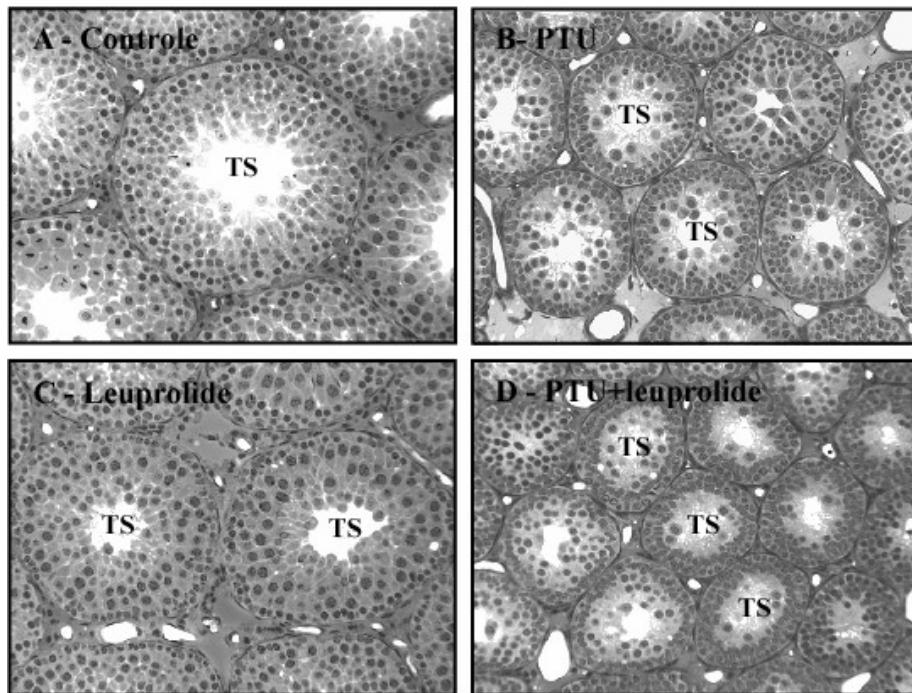


Figura 6 - Vista panorâmica do parênquima testicular dos ratos Wistar controles e tratados, sacrificados aos 36 dias de idade. Observe que nessa idade, comparado ao grupo controle, os ratos tratados com PTU e PTU+leuprolide ainda apresentam o processo espermatogênico atrasado. TS = Túbulo seminífero. Aumento = 160x.

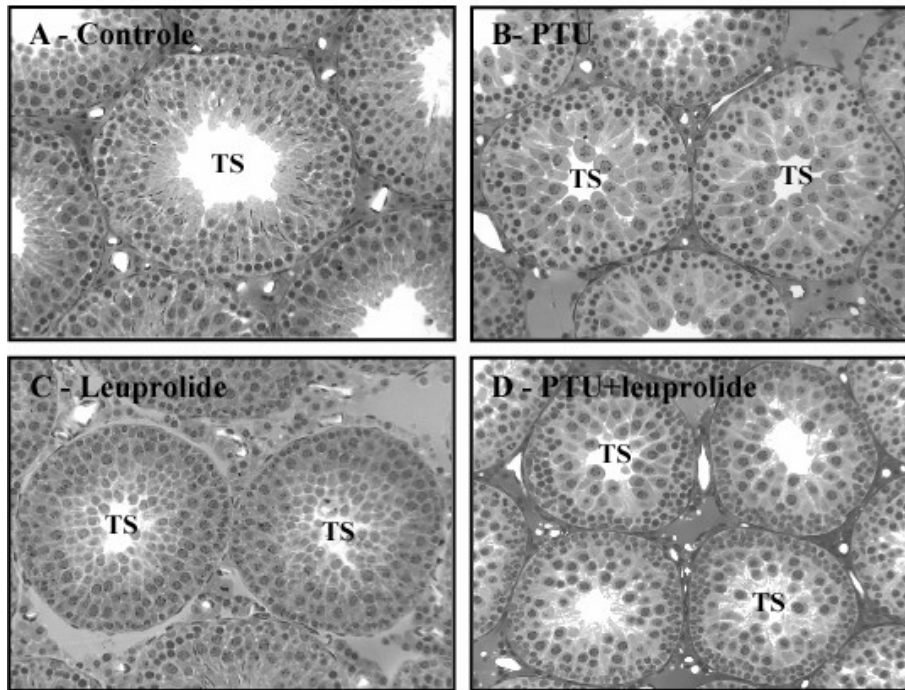
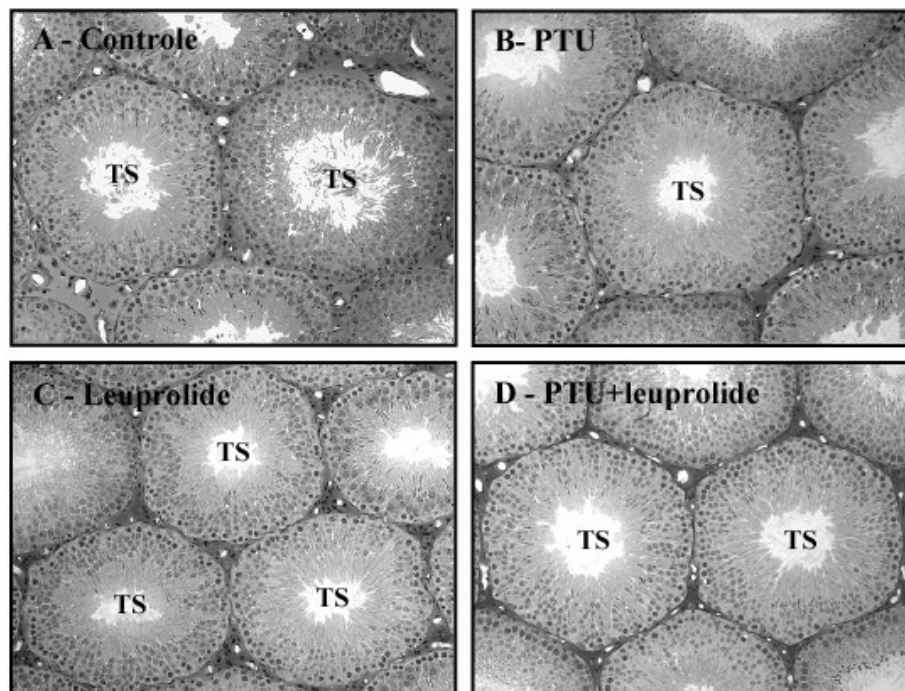
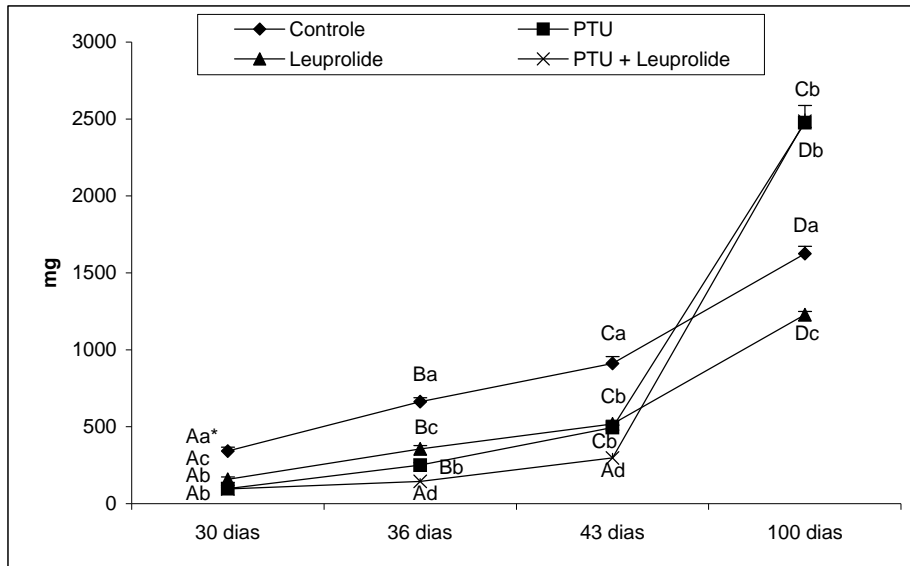


Figura 7 - Vista panorâmica do parênquima testicular dos ratos Wistar controles e tratados, sacrificados aos 43 dias de idade. Nessa idade, já praticamente não se observa diferença do desenvolvimento processo espermatogênico nos animais tratados com PTU e PTU+leuprolide em comparação com o grupo controle. TS = Túbulo seminífero. Aumento = 160x.



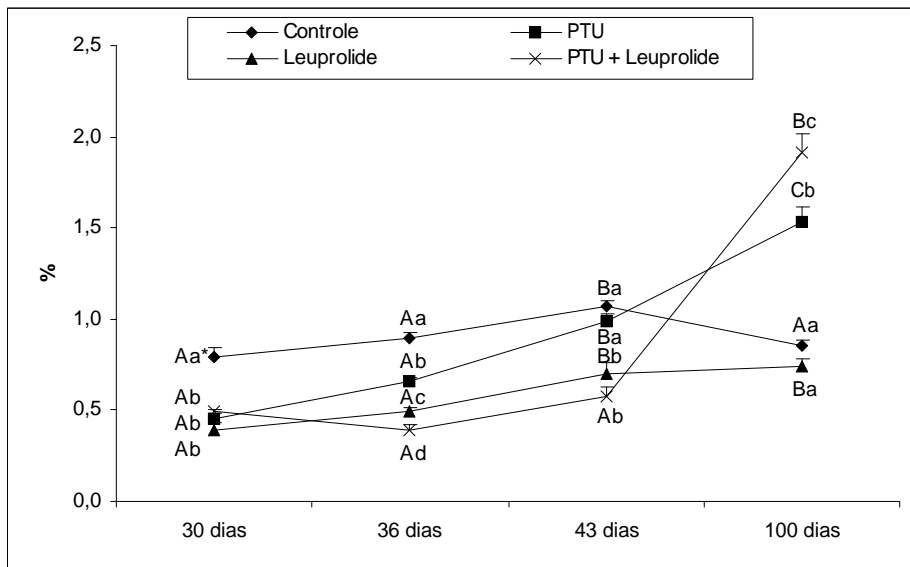
Figuras 8 - Vista panorâmica do parênquima testicular dos ratos Wistar controles e tratados, sacrificados aos 100 dias de idade. Nessa idade, com exceção do tratamento somente com leuprolide, os diâmetros tubulares nos outros grupos experimentais são equivalentes. TS = Túbulo seminífero. Aumento = 105x.



* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)
 Letras minúsculas diferentes para a mesma idade representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)
 Figura 9. Peso testicular (mg) de ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, leuprolide e PTU + leuprolide, e avaliados em diferentes idades.

A Figura 10 mostra os dados referentes ao índice gonadossomático. Entre 30 e 43 dias de idade, comparado com o grupo controle, praticamente todos os grupos tratados apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) neste índice, particularmente aos 43 dias de

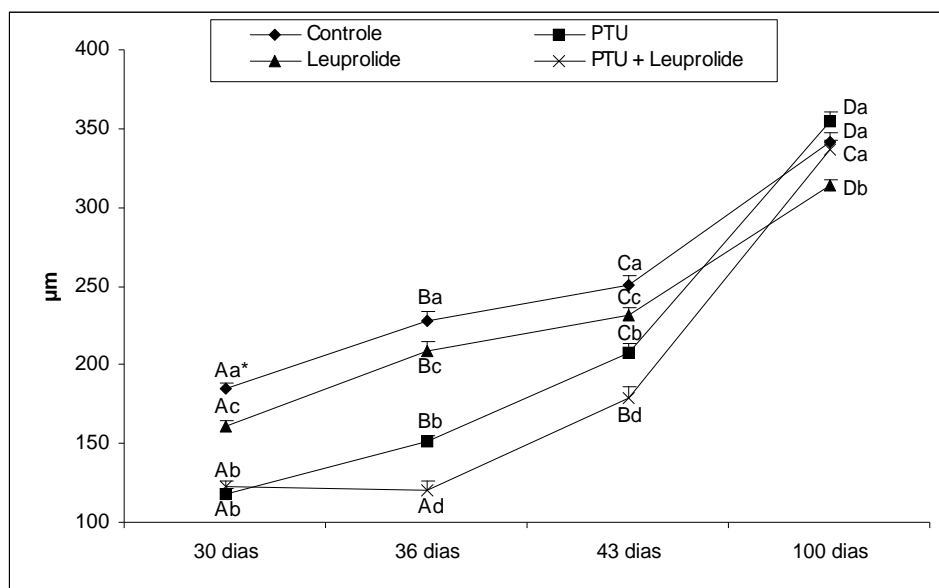
idade nos animais tratados com PTU+leuprolide. Entretanto, aos 100 dias de idade, o índice gonadossomático apresentou-se bastante elevado ($p < 0,05$) nos dois grupos tratados com PTU, principalmente no grupo que recebeu PTU em associação com leuprolide.



* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)
 Letras minúsculas diferentes para a mesma idade representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)
 Figura 10. Índice gonadossomático (%) de ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, leuprolide e PTU + leuprolide, e avaliados em diferentes idades.

O diâmetro tubular é o parâmetro que melhor reflete a evolução do processo espermatogênico durante o desenvolvimento pós-natal do testículo em mamíferos de reprodução não sazonal. Conforme pode ser observado nas Figuras de 5, 6, 7, 8, 11, aos 30 e 36 dias de idade o diâmetro tubular nos ratos tratados com PTU e, particularmente, naqueles tratados com PTU+leuprolide, foi nitidamente menor (37-34% e 34-47%, respectivamente; $p < 0,05$) em comparação com o grupo controle. Apesar de ainda se apresentarem menores ($p < 0,05$), tendência de recuperação para estes grupos tratados foi encontrada aos 43 dias de

idade. No entanto, à semelhança dos 36 dias de idade, aos 43 dias, o diâmetro tubular dos animais tratados com PTU+leuprolide foi menor ($p < 0,05$) do que nos ratos tratados somente com PTU. Aos 100 dias de idade, somente no grupo tratado com leuprolide o valor encontrado para o diâmetro tubular apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). Aliás, quando comparado com os demais grupos experimentais, o diâmetro tubular para este grupo foi sempre diferente ($p < 0,05$) em todas as quatro idades avaliadas.



* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)
 Letras minúsculas diferentes para a mesma idade representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

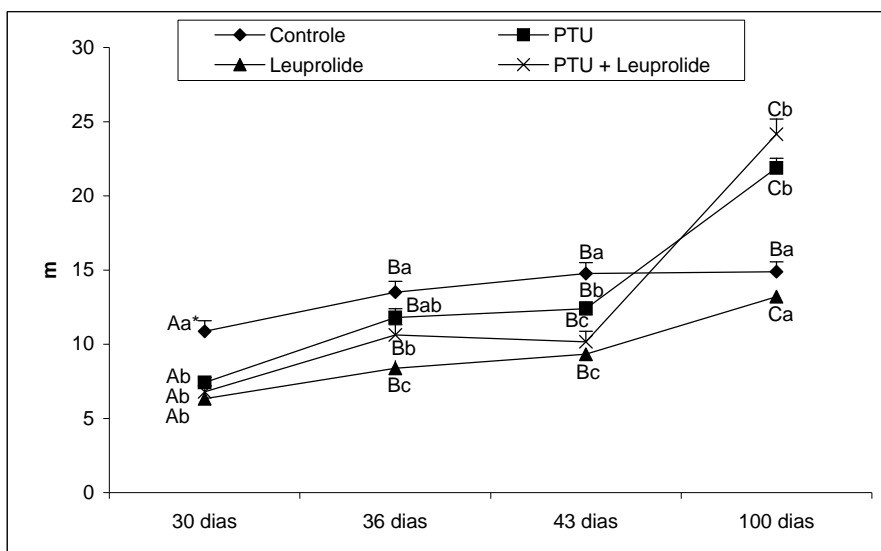
Figura 11. Diâmetro tubular (µm) de ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, leuprolide e PTU + leuprolide, e avaliados em diferentes idades.

Tendência semelhante ao observado para o índice gonadossomático e para o diâmetro tubular foi encontrada para o comprimento tubular total (Figura 12). No entanto, pode ser considerado que com exceção do grupo controle, cujos valores para o comprimento tubular total estabilizaram-se de 36 para 100 dias de idade ($p > 0,05$), nos demais tratamentos acentuado crescimento (~60% a ~130%; $p < 0,05$) para este parâmetro foi encontrado nesta faixa de idade mencionada, particularmente no grupo tratado com PTU+leuprolide.

O número total de células de Sertoli por testículo, nas diferentes idades investigadas, pode ser observado na Figura 13. Conforme esperado, o número total de células de Sertoli por testículo no grupo controle não sofreu alterações significativas ($p > 0,05$) ao longo das diferentes idades investigadas. Ao se comparar os diferentes tratamentos com o grupo controle nota-se que aos 30 dias de idade os ratos tratados com PTU já apresentavam maior número de células de Sertoli por testículo ($p < 0,05$). Tendência semelhante, porém não significativa ($p > 0,05$), foi encontrada para o

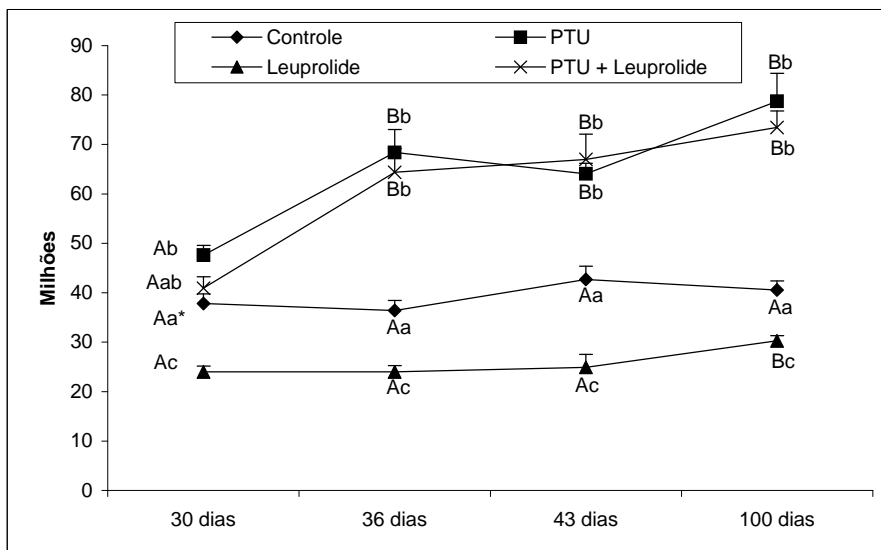
grupo experimental tratado com PTU+leuprolide. Por outro lado, os animais tratados somente com leuprolide mostraram diminuição significativa ($p < 0,05$) no número destas células. Já aos 36, 43 e 100 dias de idade, o número de células de Sertoli por testículo mostrou-se bastante elevado ($p < 0,05$) nos dois

grupos tratados com PTU, em comparação com os animais controles. Por outro lado, pode ser notado que nos animais tratados somente com leuprolide o número destas células foi sempre inferior (25-40%; $p < 0,05$) ao obtido para ratos Wistar controles.



* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)
 Letras minúsculas diferentes para a mesma idade representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Figura 12. Comprimento total de túbulos seminíferos (m) em ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, leuprolide e PTU + leuprolide, e avaliados em diferentes idades.



* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)
 Letras minúsculas diferentes para a mesma idade representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

Figura 13. Número de células de Sertoli por testículo em ratos controles e tratados no período neonatal com PTU, leuprolide e PTU + leuprolide, e avaliados em diferentes idades.

2.4. Discussão

2.4.1. Considerações gerais

Inicialmente merece ser salientado que ao se considerar os ratos Wistar tratados somente com PTU, as comparações feitas entre os diversos grupos existentes nos delineamentos experimentais por nós utilizados na presente investigação devem levar em conta a existência de dois grupos controles.

No nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro estudo avaliando os efeitos do hipotireoidismo pós-natal associado a supressores de gonadotrofinas, no período de desenvolvimento testicular que antecede a puberdade. A eficácia dos tratamentos com PTU, leuprolide e antide, bem como a associação dos mesmos, pode ser comprovado pelos valores obtidos para os níveis plasmáticos de FSH, peso corporal, biometria e morfometria testiculares, durante o desenvolvimento pós-natal e em animais adultos. Particularmente, os menores pesos testiculares observados para os animais adultos tratados com agonista (leuprolide) e antagonista (antide) de GnRH, bem como aumento marcante encontrado para o peso testicular nos ratos Wistar tratados com PTU, mostraram que os tratamentos foram eficientes em interferir nos processos relacionados aos mecanismos de desenvolvimento testicular. Ainda, os menores valores obtidos para o número total de células de Sertoli por testículo, nos animais tratados com antide e leuprolide, em associação com PTU, mostram que mesmo em concentrações baixas devido ao tratamento com PTU (Kirby et al. 1992), o FSH é ainda importante para a proliferação destas células (Miranda, 2002). Desta forma, no nosso entender, os objetivos propostos nos delineamentos experimentais foram alcançados. No entanto, um resultado de certa forma inesperado foi o aumento marcante no peso dos testículos nos ratos adultos tratados com PTU+leuprolide, o que nos levou ao desenvolvimento de vários experimentos em períodos por nós julgados importantes para o entendimento dos efeitos causados pela associação do hipotireoidismo e do leuprolide. Os diversos resultados encontrados com as abordagens utilizadas serão discutidos a seguir.

2.4.2. Efeitos do leuprolide durante o período de desenvolvimento pós-natal do testículo

A avaliação de diversos parâmetros testiculares e dos níveis plasmáticos de FSH ao longo do período de desenvolvimento pós-natal de ratos Wistar tratados com dose única de leuprolide ao nascimento, nos permite visualizar claramente o efeito bifásico desta droga (Okada et al., 1994). Apesar de não existirem dados disponíveis na literatura a este respeito, é considerado que o leuprolide age como agonista de GnRH por apenas poucas horas. Desta forma, a avaliação dos níveis plasmáticos de FSH feita 1 dia após o início do tratamento com esta droga não foi capaz de detectar o provável pico de FSH causado pela maior liberação de GnRH. No entanto, apesar de não termos quantificado o número de células de Sertoli por testículo especificamente nesta idade, os aumentos significativos observados para o índice gonadossomático e para o comprimento tubular total por testículo sugerem fortemente que a proliferação de células de Sertoli aumentou neste período. Pelo fato de nesta fase do desenvolvimento testicular as células de Sertoli serem o tipo celular predominante no testículo (Orth, 1993), este provável aumento de proliferação seria suficiente para causar incrementos consideráveis no peso testicular e no comprimento tubular, conforme observado no presente trabalho. Após 1 dia de idade, o efeito antagonista do leuprolide ficou evidenciado a partir das menores concentrações plasmáticas de FSH observadas principalmente a partir dos 3 dias de idade. Estas diminuições nos níveis de FSH refletiram diretamente em menores índice gonadossomático e comprimento tubular nos animais tratados, que foram observadas nos animais avaliados a partir dos 10 dias idade. O efeito antagonista do leuprolide se estendeu até o período compreendido entre 36 e 43 dias de idade, a partir do qual os níveis plasmáticos de FSH foram aparentemente restabelecidos, considerando-se as fases pré-púbere (43 dias) e adulta (100 dias) investigadas. Portanto, é importante mencionar que o presente trabalho mostrou, pela primeira vez que, em ratos, a depleção dos níveis plasmáticos de FSH, através da utilização da forma de longa duração (depot) do leuprolide, dura cerca de 5 semanas.

Conforme já está estabelecido na literatura, a capacidade de suporte das células de Sertoli (número de células germinativas por células de Sertoli) é relativamente fixa para cada espécie (Russell and Peterson, 1984; Orth

et al., 1988; França and Russel, 1998; França et al., 2005). Assim, o menor número de células de Sertoli encontrado para os ratos tratados com leuprolide, em associação com menor número de células germinativas, refletiu em menor diâmetro tubular observado nos animais estudados após 30 dias de idade, período este no qual os espermatócitos e as espermátides estão proliferando intensamente em ratos (Russell et al., 1989). Este mesmo raciocínio pode ser utilizado para a redução acentuada no índice gonadossomático observada de 30 aos 43 dias de idade. A menor diferença encontrada para este parâmetro nos animais adultos deve-se provavelmente ao aumento da capacidade de suporte das células de Sertoli, que ocorreu devido a menor densidade desta célula no epitélio seminífero (Miranda, 2002). Este aspecto será discutido com maiores detalhes mais adiante.

Além de inibir a produção de FSH, o leuprolide também deprime a produção de LH, resultando conseqüentemente em menor produção de andrógenos nas células de Leydig (Hadziselomovic et al., 1987; Ogawa et al., 1998). Durante o período de desenvolvimento pós-natal do testículo em ratos, o LH exerce importantes funções na proliferação e diferenciação destas células (Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2004; O'Shaughnessy et al., 2005). A ação indireta (via células de Sertoli) do FSH nestes eventos não é descartada (O'Shaughnessy et al., 2005). No presente trabalho, o tamanho individual bem como o processo de diferenciação e o número de células de Leydig por testículo não foram investigados nos animais tratados com leuprolide. Portanto, cremos que a administração de leuprolide poderia representar uma importante abordagem experimental para se investigar a proliferação e a diferenciação das células de Leydig. Pelo fato dos níveis de FSH serem muito irregulares ao longo do período de tratamento com leuprolide, seria também interessante quantificar o número total de células de Sertoli por testículo após o nascimento, no período em que estas células estão proliferando ativamente.

2.4.3. Ratos Wistar adultos tratados com PTU, leuprolide e antide durante o desenvolvimento testicular

De maneira geral, pode ser considerado que os tratamentos com PTU, leuprolide e

antide produziram os efeitos por nós esperados a partir de dados disponíveis na literatura (Joyce et al., 1993; Cooke et al., 1994; Sharpe et al., 2000; Sharpe et al., 2003; Johnston et al., 2004; Cooke et al., 2005; Holsberger et al., 2005; Jimenez-Severiano et al., 2005). Assim, em comparação com os animais controles, aumento marcante para vários parâmetros testiculares importantes (exceto aqueles relacionados com as células de Leydig que serão discutidos à parte) tais como peso testicular, volume ocupado pelos túbulos seminíferos no parênquima testicular, comprimento tubular total e produção espermática diária por testículo, foi encontrado nos animais tratados com PTU. Em contraste, redução significativa nos valores observados para estes parâmetros ocorreu nos grupos tratados com leuprolide e antide, a exemplo do que ocorre em outros trabalhos experimentais disponíveis na literatura envolvendo roedores de laboratório e outros mamíferos tais como sagüi e bovinos (Hess et al., 1993; Sharpe et al., 2000; Miranda, 2002; Sharpe et al., 2003; Johnston et al., 2004; Jimenez-Severiano et al., 2005). A magnitude destes dados obtidos foi resultante de maior ou menor proliferação de células de Sertoli que ocorreu no período que antecede a puberdade. Também pode ser inferido que os menores valores obtidos para o número total de células de Sertoli por testículo nos tratamentos associando-se o hipotireoidismo induzido pelo PTU, em associação com antide e leuprolide, indicam que mesmo em concentrações baixas nos ratos hipotireóidicos (Kirby et al., 1992; van Haaster et al., 1992), o FSH continua sendo importante para a proliferação das células de Sertoli (Miranda, 2002).

Merece ser mencionado que de maneira geral os efeitos do tratamento com antide na redução dos parâmetros mencionados foram mais acentuados em comparação com o leuprolide. Em parte, esta diferença deveu-se ao efeito agonista inicial do tratamento com leuprolide que provavelmente promoveu aumento nos níveis plasmáticos de FSH com conseqüente aumento de proliferação das células de Sertoli, conforme já aventado no item anterior da discussão. No entanto, apesar do número de células de Sertoli se apresentar numericamente maior (~15%) nos animais tratados com leuprolide, esta diferença não chegou a ser significativa. Em contraste, a produção espermática por testículo aumentou

cerca de 1/3 nos ratos que receberam leuprolide. Esta aparente discrepância pode ser explicada pelo fato de nos animais tratados com leuprolide a eficiência da célula de Sertoli ter aumentado cerca de 20%. Este intrigante resultado pode ser considerado inesperado, uma vez que a densidade de células de Sertoli no epitélio seminífero dos ratos tratados com antide seria provavelmente menor do que naqueles tratados com leuprolide (Miranda, 2002). Uma hipótese que poderia explicar este achado é a possibilidade do tratamento com antide causar alterações funcionais nas células de Sertoli diferenciadas. É interessante notar que o diâmetro tubular em ambos os grupos apresentou-se significativamente reduzido em comparação com os demais grupos, sem no entanto diferirem entre si. Para justificar pelo menos em parte o fato da célula de Sertoli ser mais eficiente nos ratos tratados com leuprolide merece ser comentado que a área ocupada pelo lume tubular neste grupo foi em torno de 30% menor. Sugerindo menor secreção de fluido através das células de Sertoli, o que de certa forma mostra que as células de Sertoli encontram-se menos funcionais.

No presente estudo resultados que podem ser considerados surpreendentes foram encontrados para o peso testicular, volume tubular, número de células de Sertoli por testículo e produção espermática nos ratos tratados com PTU+leuprolide, cujos valores apresentaram praticamente a mesma magnitude do tratamento somente com PTU. No entanto, é interessante ser mencionado que o peso corporal nos ratos tratados com PTU+leuprolide foi cerca de 20% menor, o que resultou em considerável aumento no índice gonadossomático em comparação com os ratos tratados somente com PTU. Tendência semelhante ocorreu no grupo tratado com PTU+antide. Assim, neste aspecto, pode ser considerado que a associação de PTU com antagonistas de GnRH parece promover alterações no desenvolvimento corporal de ratos Wistar. Ainda comparando-se os grupos experimentais tratados com PTU e PTU+leuprolide pode ser notado que existe uma ligeira tendência de aumento em torno de 10%, eventualmente significativo, em alguns parâmetros importantes como por exemplo comprimento tubular, eficiência da célula de Sertoli e produção espermática. Os resultados encontrados para o grupo tratado com PTU+leuprolide nos ratos adultos nos levaram a

investigar especificamente os efeitos do leuprolide e a associação do mesmo com PTU, em período por nós considerado importante durante a fase de desenvolvimento pré-puberal do testículo, ou seja, de 30 a 43 dias de idade, conforme será discutido no item 4.5.

2.4.4. Células de Leydig em ratos Wistar adultos tratados com PTU, leuprolide e antide durante o desenvolvimento testicular

Além de seus efeitos sobre a população de células de Sertoli, o tratamento com PTU também influencia a população e a função das células de Leydig (Hardy et al., 1993; Antony et al., 1995; Hardy et al., 1996; Mendis-Handagama et al., 1998; Teerds et al., 1998; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2004). Estudos quantitativos indicaram que o número de células de Leydig em animais tratados com PTU foi cerca de 70% maior do que nos animais controle. Enquanto o tamanho da célula de Leydig, o número de receptores para LH e o potencial esteroidogênico destas células estavam reduzidos (Hardy et al., 1993), sem no entanto alterar significativamente as concentrações plasmáticas de testosterona nos animais tratados. Embora não tenha sido foco principal de nosso estudo, as células de Leydig em ratos Wistar adultos também foram investigadas no presente trabalho. Em contraste com a literatura e reforçando dados encontrados em nosso laboratório (Miranda, 2002), quando se compara o grupo tratado com PTU com o grupo controle nota-se que nas nossas condições, e com a linhagem de rato utilizada, o tratamento com PTU não foi capaz de alterar o tamanho das células de Leydig e nem o número destas células por testículo, apesar deste órgão ser mais de 50% maior devido ao tratamento com PTU.

Ao se comparar os grupos tratados com antide e leuprolide fica evidenciado que os efeitos destes dois tratamentos em vários dos parâmetros analisados para as células de Leydig podem ser considerados diferentes. Por exemplo, a proporção (%) de núcleo na célula e o volume nuclear são significativamente menores nos ratos tratados com antide. Em contrapartida, os valores observados para o número de células de Leydig por grama e por testículo estão entre ~35 a ~60% maiores. Portanto, à semelhança do observado para a eficiência da célula de Sertoli e a produção espermática, estes tratamentos são capazes de

produzirem efeitos de certa forma distintos. Neste contexto, merece ser comentado que o tratamento com leuprolide é utilizado para aumentar a eficiência do transplante de espermatogônias ao propiciar maior proliferação destas células (Ogawa et al., 1998), o que em última análise levaria a maior eficiência das células de Sertoli e mesmo da produção espermática. Comparado com os demais grupos, chama-nos a atenção o fato do tratamento com PTU+leuprolide resultar em nos menores valores para o percentual de células de Leydig no testículo, volume nuclear, volume citoplasmático e volume individual destas células. Reforçando assim a particularidade deste tratamento na função testicular.

2.4.5. Efeitos do leuprolide e leuprolide+PTU durante a fase de desenvolvimento pré-puberal do testículo

Conforme esperado (Steinberger et al., 1971; Orth, 1982; Bortolussi et al., 1990), a partir dos 30 dias de idade o número de células de Sertoli por testículo nos ratos controles mostrou-se bastante estável, apesar de ligeira tendência de aumento (~15%) ter sido observada nas idades de 43 e 100 dias. De acordo com o mencionado no item 4.2, a supressão dos níveis plasmáticos de FSH através do leuprolide encerrou-se em torno de 5 semanas após o início do tratamento. Período este no qual o processo espermatogênico encontrava-se ainda bastante atrasado nos ratos tratados com PTU e, particularmente, naqueles tratados com PTU+leuprolide, em decorrência principalmente do maior grau de imaturidade das células de Sertoli que refletiu diretamente na evolução do processo espermatogênico. Desta forma, pode ser inferido que no grupo tratado com PTU+leuprolide estas células apresentavam ainda alta capacidade mitótica que poderia ser estimulada através de altas concentrações de FSH, que é considerado o principal fator mitogênico para as células de Sertoli (Orth, 1982; Almirón and Chemes, 1988; Sharpe, 1994; França & Chiarini-Garcia, 2005). De fato, ao que parece, esta condição foi suficiente para aumentar o número de células de Sertoli por testículo no mesmo patamar encontrado aos 100 dias de idade para o tratamento somente com PTU. Refletindo ainda diretamente nos incrementos observados para o peso testicular, volume tubular e produção espermática. Efeito semelhante foi observado

em sagüis tratados com antagonista de GnRH de longa duração (antide), nos quais o número de células de Sertoli teve período de proliferação estendido após o encerramento dos efeitos do tratamento, retornando ao mesmo patamar observado para os animais controles (Sharpe et al., 2000). No presente estudo, o tratamento somente com leuprolide não foi capaz de promover os mesmos efeitos encontrados em sagüis por Sharpe e colaboradores. Desta forma, pode ser inferido que a maior proliferação das células de Sertoli nos ratos tratados com PTU+leuprolide deveu-se em grande parte ao status mais imaturo destas células em decorrência do hipotireoidismo (van Haaster et al., 1992). Os resultados encontrados em sagüis com a utilização de antide de longa duração e os resultados por nós encontrados em ratos com o leuprolide sugerem novamente um efeito diferente destas drogas na função testicular. No entanto, a particularidade de cada espécie não pode ser descartada, uma vez que o padrão de proliferação pós-natal das células de Sertoli é diferente nestas duas espécies de mamíferos (Sharpe et al., 2003).

2.5. Referências bibliográficas

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anatomical Record*, v.94, p.238-248, 1946.
- ALBRECHT, K.H.; EICHER, E.M. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental Biology*, v.240, n.1, p.92-107, 2001.
- ALMIRON, I.; CHEMES, H. Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. *International Journal of Andrology*, v.11, n.3, p.235-246, 1988.
- AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls: III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *American Journal of Anatomy*, v.110, p.49-67, 1962.
- ANTONY, F.F.; ARULDHAS, M.M.; UDHAYAKUMAR, R.C. et al. Inhibition of Leydig cell activity in vivo and in vitro in

- hypothyroid rats. *Journal of Endocrinology*, v.144, n.2, p.293-300, 1995.
- ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, v.8, n.3, p.219-241, 1963.
- BERNDTSON, W.E.; IGBOELI, G.; PICKETT, B.W. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *Journal of Animal Science*, v.64, n.1, p.241-246, 1987.
- BORTOLUSSI, M.; ZANCHETTA, R.; BELVEDERE, P. et al. Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotropin receptors in rat testis from birth to puberty. *Cell and Tissue Research*, v.260, n.1, p.185-191, 1990.
- CAPEL, B. Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annual Review of Physiology*, v.60, p.497-523, 1998.
- COOKE, P.S.; HESS, R.A.; KIRBY, J.D. A model system for increasing testis size and sperm production: potential application to animal science. *Journal of Animal Science*, v.72, n.43-54, 1994.
- COOKE, P.S.; HOLSBERGER, D.R.; FRANÇA, L.R. Thyroid hormone regulation of Sertoli cell development. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D., (Ed.). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.217-226.
- COOKE, P.S.; MEISAMI, E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology*, v.129, p.237-243, 1991.
- COOKE, P.S.; PORCELLI, J.; HESS, R.A. Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biology of Reproduction*, v.46, n.1, p.146-154, 1992.
- DORTS, V.J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklung. *Monatsh Veterinarmed*, v.29, n.17, p.650-652, 1974.
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. *Tese (Doutorado)*, Belo Horizonte, UFMG – Instituto de Ciências Biológicas, 1991. 185p.
- FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION (ICAR), 12, 1992, Netherlands, *Resumos*. Netherlands: The Hague, 1992. p.1716-1718.
- FRANCA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.300-318, 2005.
- FRANCA, L.R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B., (Ed.). *A Célula: Uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Ed. Manole, 2005. v.01, p.302-324.
- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTÍNEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J., (Ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. España: Churchill Communications Europe España, 1998. p.197-219.
- GONDOS, B.; BERNDSTON, W. Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL, L.; GRISWOLD, M., (Ed.). *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press, 1993. p.115-154.
- HADZISELIMOVIC, F.; SENN, E.; BANDHAUER, K. Effect of treatment with chronic gonadotropin releasing hormone agonist on human testis. *Journal of Urology*, v.138, n.4 Pt 2, p.1048-1050, 1987.
- HARDY, M.P.; KIRBY, J.D.; HESS, R.A. et al. Leydig cells increase their numbers but decline in steroidogenic function in the adult rat after neonatal hypothyroidism. *Endocrinology*, v.132, n.6, p.2417-2420, 1993.
- HARDY, M.P.; SHARMA, R.S.; ARAMBEPOLA, N.K. et al. Increased

- proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat. *Journal of Andrology*, v.17, n.3, p.231-238, 1996.
- HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D. et al. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology*, v.132, n.6, p.2607-2613, 1993.
- HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, n.2, p.209-213, 1978.
- HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; MONET-KUNTZ, C.; COUROT, M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.34, p.101-114, 1987.
- HOLSBERGER, D.R.; KIESEWETTER, S.E.; COOKE, P.S. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor alpha1. *Biology of Reproduction*, v.73, n.3, p.396-403, 2005.
- JIMENEZ-SEVERIANO, H.; MUSSARD, M.L.; FITZPATRICK, L.A. et al. Testicular development of Zebu bulls after chronic treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Journal of Animal Science*, v.83, n.9, p.2111-2122, 2005.
- JOHNSON, L.; CARTER, G.K.; VARNER, D.D. et al. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.100, n.1, p.315-321, 1994.
- JOHNSTON, H.; BAKER, P.J.; ABEL, M. et al. Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology*, v.145, n.1, p.318-329, 2004.
- JOYCE, K.L.; PORCELLI, J.; COOKE, P.S. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *Journal of Andrology*, v.14, n.6, p.448-455, 1993.
- KIRBY, J.D.; JETTON, A.E.; COOKE, P.S. et al. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. *Endocrinology*, v.131, n.2, p.559-565, 1992.
- LUAN, X.; BODMEIER, R. In situ forming microparticle system for controlled delivery of leuprolide acetate: influence of the formulation and processing parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.27, n.2-3, p.143-149, 2006.
- MCLAREN, A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.163, n.1-2, p.3-9, 2000.
- MENDIS-HANDAGAMA, C.; ARIYARATNE, S. Prolonged and transient neonatal hypothyroidism on Leydig cell differentiation in the postnatal rat testis. *Archives of Andrology*, v.50, n.5, p.347-357, 2004.
- MENDIS-HANDAGAMA, S.M.; ARIYARATNE, H.B.; TEUNISSEN VAN MANEN, K.R. et al. Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biology of Reproduction*, v.59, n.2, p.351-357, 1998.
- MIRANDA, J.R. Efeitos do tratamento neonatal com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) e FSH na proliferação das células de Sertoli e função testicular em ratos Wistar adultos. *Dissertação (Mestrado)*, Belo Horizonte, UFMG - Escola de Veterinária, 2002. 47p.
- OGAWA, T.; DOBRINSKI, I.; AVARBOCK, M.R. et al. Leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist, enhances colonization after spermatogonial transplantation into mouse testes. *Tissue and Cell*, v.30, n.5, p.583-588, 1998.
- OGAWA, Y.; OKADA, H.; HEYA, T. et al. Controlled release of LHRH agonist, leuprolide acetate, from microcapsules: serum drug level profiles and pharmacological effects in animals. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.41, n.7, p.439-444, 1989.

OKADA, H.; DOKEN, Y.; OGAWA, Y. et al. Sustained suppression of the pituitary-gonadal axis by leuporelin three-month depot microspheres in rats and dogs. *Pharmaceutical Research*, v.11, n.8, p.1199-1203, 1994.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anatomical Record*, v.203, n.4, p.485-492, 1982.

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

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v.122, n.3, p.787-794, 1988.

ORTH, J.M.; JESTER JR, W.F. NCAM mediates adhesion between gonocytes and Sertoli cells in cocultures from testes of neonatal rats. *Journal of Andrology*, v.16, n.5, p.389-399, 1995.

O'SHAUGHNESSY, P.J.; BAKER, P.J.; JOHNSTON, H. Neuroendocrine regulation of Leydig cell development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1061, p.109-119, 2005.

PALMER, S.J.; BURGOYNE, P.S. In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development*, v.112, n.1, p.265-268, 1991.

PRINCE, F.P.; MANN, D.R.; FRASER, H.M. Blockade of the hypothalamic-pituitary-testicular axis with a GnRH antagonist in the neonatal marmoset monkey: changes in Leydig cell ultrastructure. *Tissue and Cell*, v.30, n.6, p.651-661, 1998.

RUSSELL, L.D.; BARTKE, A.; GOH, J.C. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to

tubular fluid secretion and flow. *American Journal of Anatomy*, v.184, n.3, p.179-189, 1989.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P. et al. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. 1. Clearwater, Fla.: Cache River Press, 1990. 286p.

RUSSELL, L.D.; FRANCA, L.R. Building a testis. *Tissue and Cell*, v.27, n.2, p.129-147, 1995.

RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.70, n.2, p.635-641, 1984.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D., (Ed.). *The physiology of reproduction*. 2. New York: Raven Press, 1994. v.1, p.1363-1434.

SHARPE, R.M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, v.125, n.6, p.769-784, 2003.

SHARPE, R.M.; WALKER, M.; MILLAR, M.R. et al. Effect of neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist administration on Sertoli cell number and testicular development in the marmoset: comparison with the rat. *Biology of Reproduction*, v.62, n.6, p.1685-1693, 2000.

SPRANDO, R.L. Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. In: RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIN, A.P.; CLEGG, E.D., (Ed.). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press, 1990. p.277-280.

STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biology of Reproduction*, v.4, n.1, p.84-87, 1971.

TEERDS, K.J.; DE ROOIJ, D.G.; DE JONG, F.H. et al. Development of the adult-type

Leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. *Biology of Reproduction*, v.59, n.2, p.344-350, 1998.

VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R. et al. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology*, v.131, n.3, p.1574-1576, 1992.

VERGOUWEN, R.P.; JACOBS, S.G.; HUISKAMP, R. et al. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, n.1, p.233-243, 1991.

WANG, Z.X.; WREFORD, N.G.; DE KRETZER, D.M. Determination of Sertoli cell numbers in the developing rat testis by stereological methods. *International Journal of Andrology*, v.12, n.1, p.58-64, 1989.

3. CAPÍTULO II

PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI NA REGIÃO DE TRANSIÇÃO ENTRE OS TÚBULOS SEMINÍFEROS E *RETE TESTIS* EM RATOS WISTAR PRÉ-PÚBERES

RESUMO

De acordo com a literatura, a proliferação pós-natal das células de Sertoli em ratos ocorre somente até o final da terceira semana de idade. Também já está estabelecido que o FSH é o principal fator mitogênico para as células de Sertoli, enquanto o hormônio triiodotironina (T3) é responsável pela maturação/diferenciação dessas células. No entanto, em diversas espécies de mamíferos já investigadas, o peso testicular, comprimento total de túbulos seminíferos e produção espermiática diária aumentam significativamente em animais sexualmente maduros sem aumento evidente no diâmetro tubular e eficiência das células de Sertoli, sugerindo que proliferação dessas células pode ainda eventualmente ocorrer. Dessa forma, o presente trabalho teve como principal objetivo investigar se as células de Sertoli presentes na região de transição entre os túbulos seminíferos e *rete testis* apresentam capacidade mitótica por um período de tempo mais prolongado, uma vez que as mesmas parecem sofrer diferenciação mais tardiamente. Com essa finalidade, foram realizadas análises estruturais destas células em ratos Wistar com idades entre 26 e 36 dias, utilizando-se microscopias óptica e eletrônica de transmissão e marcação imunohistoquímica para o filamento intermediário vimentina. Essas análises mostraram que as células localizadas na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* eram predominantemente células de Sertoli e que as mesmas apresentavam-se com características morfológicas de células imaturas. Figuras eventuais de mitoses foram também observadas nessa região. A partir desses resultados, o tratamento com a droga bociogênica propiltiouracil (PTU) em ratos com idades entre 21 e 40 dias foi realizado, visando verificar se a maturação dessas células também é mediada pelo hormônio T3. Os resultados encontrados para o peso testicular e o diâmetro tubular nos ratos sacrificados aos 40 dias mostraram que o tratamento com PTU foi efetivo. Aos 160 dias de idade, o peso testicular, comprimento total de túbulos seminíferos, número de células de Sertoli por testículo e a produção espermiática diária foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos animais tratados com PTU na fase pré-puberal, sugerindo fortemente que a maturação das células de Sertoli presentes na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* é também mediada pelo hormônio tireoideano T3. No entanto, resta ainda investigar os mecanismos responsáveis pelo retardamento de maturação/diferenciação dessas células.

PALAVRAS-CHAVE: Rato, testículo, túbulos seminíferos, *rete testis*, célula de Sertoli, espermatogênese, triiodotironina

SERTOLI CELL PROLIFERATION IN THE TRANSITION REGION BETWEEN SEMINIFEROUS TUBULES AND *RETE TESTIS* IN PREPUBERTAL WISTAR RATS

ABSTRACT

According to the literature, the postnatal proliferation of the Sertoli cells in rats only occurs until the end of the third week of age. It is already established that the FSH is the main mitogenic factor regarding the Sertoli cells, while the triiodothyronine hormone (T3) is responsible for the maturation/differentiation of these cells. However, in several species of mammals, already investigated, the testis weight, total length of seminiferous tubules and daily sperm production significantly increase in sexually mature animals without any evident increase in the tubular diameter and efficiency of the Sertoli cells, suggesting that the proliferation of such cells can eventually still occur. Thereby, the present work has as main objective to investigate if the Sertoli cells present in the transition region, between the seminiferous tubules and the *rete testis*, present a longer-period mitotic capacity, since they seem to suffer a delayed differentiation. With this purpose, structural analyzes of these cells had been carried through in Wistar rats, with ages between 26 and 36 days, using transmission optical and electronic microscopy and immunocytochemistry marking for the vimentin intermediate filaments. These analysis had shown that the cells, located in the transition region between the seminiferous tubules and *rete testis*, were predominantly Sertoli cells and

that they presented morphologic characteristics of immature cells. Eventual figures of mitoses also had been observed in this region. Starting from these results, in order to verify if the maturation of these cells is also mediated by the T3 hormone, a treatment with the goitrogen drug propiltiouracil (PTU) in rats, with ages between 21 and 40 days, was carried through. The results found for the testis weight and tubular diameter in the rats sacrificed at 40 days had shown that the treatment with PTU was effective. At 160 days of age, the testis weight, total length of seminiferous tubules, Sertoli cell number per testis and daily sperm production had been significantly bigger ($p < 0.05$) in the animals treated at the prepubertal phase with PTU, suggesting that the maturation of the Sertoli cells presents in the transition region between the seminiferous tubules and *rete testis* is also mediated by the thyroid hormone T3. However, investigating the responsible mechanisms for the maturation/differentiation slowdown of these cells, is yet to be done.

KEY-WORDS: Rat, testis, seminiferous tubules, *rete testis*, Sertoli cell, spermatogenesis, triiodothyronine

3.1. Introdução

A célula de Sertoli é o elemento chave do processo espermatogênico, sendo considerada uma das mais complexas células do corpo animal, tanto do ponto de vista funcional quanto estrutural (Russell & Griswold, 1993). Durante o desenvolvimento testicular em mamíferos, as células de Sertoli apresentam duas fases bem características: fase proliferativa, na qual essas células sofrem sucessivas mitoses; e fase de diferenciação, na qual as mesmas iniciam o processo de maturação e se tornam capazes de realizar suas variadas e importantes funções. O encerramento da fase proliferativa e início do processo de diferenciação são mediados pelo hormônio tireoideano triiodotironina (T3; Cooke, 1991; Hess et al., 1993; Cooke et al., 2005). Em ratos, o encerramento da fase proliferativa das células de Sertoli ocorre aproximadamente aos 20 dias de idade (Orth, 1982; Almirón & Chemes, 1988).

Estudos recentes demonstraram que as células de Sertoli proliferam em peixes adultos (Schulz et al., 2005). Apesar de ser ainda controverso, alguns estudos tem mostrado que em mamíferos de reprodução sazonal (equinos e hamsteres) as células de Sertoli podem se dividir após a maturidade sexual (Johnson & Thompson, 1983; Tarulli et al., 2006). No entanto, nas espécies de mamíferos não sazonais investigadas até o presente momento, considera-se que as células de Sertoli não mais se dividem após a puberdade, constituindo uma população fixa no testículo (Orth, 1982; França et al., 2000; França et al., 2005). Porém, em ratos, é comum observar aumento do peso testicular após essa fase (Ekwall et al., 1984; Berndtson & Thompson, 1990; Meisami et al., 1992; Russell, 1992), mesmo havendo estabilização do

diâmetro tubular (Ekwall et al., 1984). Também em suínos, apesar da eficiência espermatogênica (produção espermática diária por grama de testículo) se manter estável após a maturidade sexual (Swierstra, 1973; França, 1987; Castro et al., 1991; França et al., 2000; França et al., 2005), o comprimento total de túbulos seminíferos e a produção espermática diária por testículo continuam a aumentar (Swierstra, 1973; Castro et al., 1991; França, 1991). Aliás, nessa última espécie, o peso testicular aumenta pelo menos até quatro anos de idade (Podany, 1969; Swierstra, 1973).

O epitélio da região terminal dos túbulos seminíferos, na transição com a rede testicular, é constituído principalmente por aglomerado de células de Sertoli e algumas poucas espermatogônias (Dym, 1974; Osman & Ploen, 1978). Portanto, seria lógico especular que o aumento em comprimento dos túbulos seminíferos ocorra a partir do pool de células de Sertoli presentes na região de transição, e mesmo da proliferação de eventuais espermatogônias aí localizadas. Considerando que a vimentina é o principal tipo de filamento intermediário presente nas células de Sertoli (Russell & Griswold, 1993) e que as células germinativas não apresentam esse filamento em seu citoplasma, a vimentina pode ser utilizada como marcador específico para as células de Sertoli, diferenciando-as das células germinativas (Mali et al., 1987). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar se as células de Sertoli presentes nessa região apresentam capacidade de proliferação por período mais longo, bem como verificar se a maturação dessas células é também regulada pelos hormônios tireoideanos.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Animais e tratamento

No presente experimento foram utilizados um total de 47 ratos Wistar machos. Desses, 39 animais foram divididos em dois grupos experimentais, conforme segue:

- Grupo I, controle, n = 27, dos quais 15 são ratos controles históricos de outros experimentos realizados nas mesmas condições;

- Grupo II, tratamento com PTU de 21 a 40 dias de idade, n = 12.

Os animais de cada grupo permaneceram em caixas plásticas separadas, com as respectivas mães, até 20 dias após o nascimento, período em que se procedeu a retirada das fêmeas (desmame). Aos 21 dias de idade iniciou-se o tratamento do grupo II com a droga bociogênica PTU (6-propil-2-tiouracil, Sigma), encerrando-se o mesmo aos 40 dias de idade. O PTU, na concentração de 0,03%, foi colocado na água de beber dos animais. Visando melhorar a palatabilidade dessa droga, que tem sabor amargo, foram adicionadas 10 gotas de adoçante (Adocyl) por litro de solução utilizada. Todos os animais foram mantidos em biotério climatizado do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, com temperatura média de 22°C, umidade média de 70% e 12 horas diárias de luminosidade. Água e ração peletizada foram disponibilizadas *ad libitum*.

Quatro animais de cada grupo experimental acima citado foram sacrificados com a finalidade de se investigar o grau de desenvolvimento testicular ao final do período de tratamento (40 dias de idade). Os animais remanescentes (oito de cada grupo) foram sacrificados aos 160 dias de idade.

Além dos dois grupos experimentais já mencionados, 6 ratos Wistar com idades entre 26 e 36 dias foram sacrificados, com a finalidade de se investigar o status de maturação das células de Sertoli presentes na região de transição entre túbulos seminíferos e rede testicular, através de microscopia eletrônica de transmissão (26 e 36 dias de idade; n = 3 para cada idade). A presença de filamento intermediário (vimentina) também foi investigada nessa mesma região, através da técnica de imuno-histoquímica, em ratos imaturos com 28 dias de idade (n = 2), completando assim o total de 47 ratos Wistar utilizados.

3.2.2. Colheita de material

Na época programada para o sacrifício, os animais foram pesados, anestesiados com pentobarbital sódico (Tiopental, Cristália) (5 mg/100g de peso corporal), heparinizados (Liquemine, Roche) (125 UI Kg/peso corporal) e perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução salina 0,9%, por alguns minutos. Após essa etapa, os animais foram fixados com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,2, durante 25-30 minutos, segundo técnica citada por Sprando (1990). Em seguida, os testículos foram coletados, dissecados e pesados. Exceção feita para os animais cujos testículos foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica, que foram fixados pela mesma técnica. No entanto, o fixador utilizado foi o paraformaldeído a 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4.

De cada animal dos grupos controle e tratados com PTU, fragmentos transversais do testículo direito ou esquerdo, com até 3 mm de espessura, foram colhidos. Esses fragmentos foram imersos em glutaraldeído 4% e no mesmo tampão, por um período de até 24 horas. Após esse período, o material foi armazenado a 4°C, no mesmo tampão. Para os estudos em microscopia de luz, os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, Leica). Cortes histológicos com 4 µm de espessura foram obtidos com navalha de vidro, sendo posteriormente corados com azul de toluidina-borato de sódio a 1% para análises histológica e morfométrica.

Após a fixação inicial, os testículos dos animais que foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica foram imersos em paraformaldeído a 2% por um período adicional de até 24 horas. Posteriormente, fragmentos transversais retirados próximos à rede testicular, com até 3 mm de espessura, foram colhidos, lavados em três banhos de tampão PBS, com 10 minutos de duração cada, a 4°C. Em seguida, foram lavados e desidratados em série crescente de álcoois e incluídos rotineiramente em paraplast. Secções histológicas com 4 µm de espessura foram obtidas com navalha de vidro e submetidas à técnica de imuno-histoquímica.

3.2.3. Análises histológica e morfométrica dos testículos

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Essas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero e foram realizadas utilizando-se retículo micrométrico acoplado a uma das oculares de 10x, em aumento final de 100x e 400x. As proporções volumétricas dos diversos constituintes do parênquima testicular, tais como compartimento tubular (lume, epitélio e túnica própria) e compartimento intertubular (células de Leydig, vasos e outros), foram estimadas utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 400x. Para cada animal foram analisados 15 campos, escolhidos ao acaso, perfazendo-se um total de 6615 pontos. O volume (mL) de cada componente testicular foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor desse último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea. Em ratos adultos, considera-se que o peso da túnica albugínea corresponde a 6,5% do peso bruto do testículo (Russell & França, 1995). Nos animais em desenvolvimento, o percentual da túnica albugínea foi estimada a partir da proporção volumétrica da mesma no testículo. Pelo fato da densidade do testículo ser muito próxima de 1 (1,03 a 1,04; França, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

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; Dorts & Sajonski, 1974):

$$CT = VTS/\pi R^2 \text{ onde,}$$

VTS é igual ao volume total dos túbulos seminíferos no testículo, e πR^2 é a área de secção transversal de túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2).

3.2.4. Contagem celular

A estimativa da população de espermátides arredondadas e de células de Sertoli realizada nos animais sacrificados aos

160 dias de idade foi feita a partir de contagens dos núcleos das espermátides arredondadas e de nucléolos das células de Sertoli no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (CES), classificado de acordo com o método do sistema acrossômico (Russell et al., 1990). Nos animais sacrificados aos 40 dias de idade, a população de células de Sertoli foi estimada a partir da contagem de nucléolos de células de Sertoli, obtida independentemente do estágio do ciclo do epitélio seminífero. As contagens foram realizadas em aumento de 1000x, sendo utilizadas 10 secções transversais de túbulos seminíferos com perfis o mais arredondados possíveis, para cada animal.

Os valores obtidos para as espermátides arredondadas e células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nuclear/nucleolar e espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962).

O número de células de Sertoli por testículo foi estimado a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau-De Reviers & Lincoln (1978). A partir desse cálculo, e utilizando-se o peso líquido do testículo, foi também estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo.

Com o objetivo de se estimar a eficiência do processo espermatogênico e da célula de Sertoli nos animais sacrificados aos 160 dias de idade, foi calculada a razão entre os números corrigidos de espermátides arredondadas e de células de Sertoli, denominado índice de células de Sertoli (ICS) ou eficiência da célula de Sertoli.

A estimativa da produção espermática diária (PED) foi feita de acordo com França (1992), utilizando-se a seguinte fórmula: $PED = \text{Número total de células de Sertoli por testículo} \times ICS \times \text{frequência do estágio VII (\%)} / \text{Duração do estágio VII (dias)}$, onde ICS = número de espermátides arredondadas por célula de Sertoli no estágio VII. O valor utilizado para a duração do estágio VII foi o citado por Russell et al. (1990).

3.2.5. Imuno-histoquímica

Secções histológicas dos testículos de animais de 28 dias de idade foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica para identificação de vimentina. Essas secções foram colocadas em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina para facilitar a aderência dos cortes histológicos. Tais secções foram submetidas à imuno-histoquímica utilizando-se a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP – ready to use – LabVision).

A recuperação antigênica foi feita incubando-se as secções histológicas em Solução Retrieval (Dako), em banho-maria a 98°C, por 20 minutos. Posteriormente, foram incubadas com H₂O₂ na concentração de 3%, em metanol, por 15 minutos, para bloquear a peroxidase endógena. A seguir, os cortes foram incubados em câmara úmida, conforme segue: 15 minutos com soro normal de coelho, para bloquear sítios de reação inespecífica dos anticorpos; 1 hora com anticorpos anti-vimentina, à temperatura ambiente; lavagem em PBS, seguida de incubação por 15 minutos com anticorpo secundário biotilado. A reação do complexo estreptavidina-biotina foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Para visualizar a ligação dos anticorpos, os cortes foram cobertos com 3,3- diaminobenzidina (DAB, Sigma). As secções foram contracordadas com Hematoxilina de Mayers.

3.2.6. Processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET), fragmentos próximos à região da rede testicular foram obtidos a partir de testículos de animais submetidos à perfusão com glutaraldeído 4%. Em seguida, esses fragmentos foram lavados e armazenados por várias semanas em tampão fosfato 0,05M, pH 7,2, a 4°C.

Após esse período, o material foi fixado novamente (fixador secundário) em tetróxido de ósmio (OsO₄) 1%, reduzido com ferrocianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]) 1,5%, em água destilada, durante cerca de 90 minutos (Langford & Coggeshall, 1980). Em seguida, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool e acetona. A inclusão foi feita em mistura Epon 812-Araldite 502 (Voelz & Dworkin, 1962), em cápsulas de plástico, seguindo-se a polimerização

seqüencial em estufas de 35°C, 45°C e 60°C, por 24, 24 e 48 horas, respectivamente.

Os cortes semifinos (0,5 - 1,0 µm) foram obtidos em ultramicrotomo Leica RM 2165 e corados com azul de toluidina-borato de sódio a 1% (Pease, 1964), para análise em microscópio de luz. A partir dessa análise, as áreas de interesse foram selecionadas para a obtenção de cortes ultrafinos (90 - 100 nm), os quais foram montados em tela de cobre (200 mesh) e contrastados pelo acetato de uranila a 2% durante 10 minutos (Watson, 1958), e citrato de chumbo por 5 minutos (Reynolds, 1963). Os cortes foram analisados no microscópio eletrônico Zeiss EM-10 do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEMEL-UFMG).

3.2.7. Análise Estatística

Todos os dados obtidos para os diferentes experimentos foram expressos como média ± erro padrão da média. Os valores médios foram submetidos ao teste t de Student. Esses testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software STATISTICA 3.11 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA, 1995). O nível de significância considerado foi de p < 0,05.

3.3. Resultados

3.3.1. Avaliação morfológica

A análise morfológica detalhada da região de transição entre os túbulos seminíferos e rede testicular dos testículos de animais sacrificados aos 26 e 36 dias de idade, através de microscopias óptica e eletrônica de transmissão (MET), revelou a presença de células de Sertoli com características morfológicas de células imaturas (Figura 1). Células apresentando características morfológicas de divisão mitótica também foram eventualmente observadas nessa região específica do testículo (Figura 2).

A técnica de imuno-histoquímica para identificação de vimentina evidenciou forte marcação para esses filamentos intermediários nas células presentes na região de transição entre túbulos seminíferos e a rede testicular (Figura 3), confirmando assim os resultados encontrados através de MET que demonstraram serem essas células as células de Sertoli.

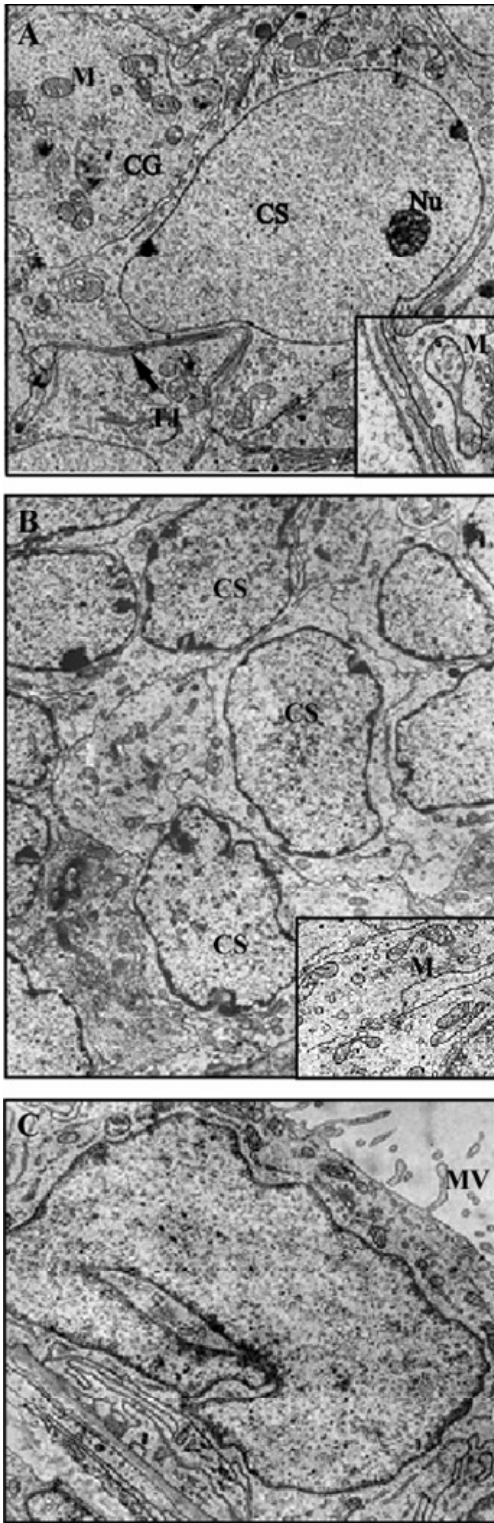


Figura 1 – Microscopia eletrônica de transmissão da região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* em ratos Wistar com 26 dias de idade. Na Figura A observa-se célula germinativa (CG) com mitocôndrias (M) com cristas lamelares e células de Sertoli (CS) com aspecto de célula em processo de diferenciação, conforme evidenciado pelo núcleo contendo nucléolo (Nu) relativamente evidente e a presença de junção de oclusão (TJ) entre duas células de Sertoli adjacentes. No detalhe dessa figura observa-se mitocôndria (M) alongada e com cristas tubulares característica de células de Sertoli de ratos. A Figura B mostra células de Sertoli localizadas na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis*. Essas células apresentam-se com características morfológicas de células de Sertoli imaturas e ausência de junções de oclusão entre células adjacentes. O detalhe dessa figura mostra mitocôndrias semelhantes àsquelas da Figura A. Já na Figura C observa-se célula epitelial característica da *rete testis* e apresentando microvilosidades (MV) voltadas para o lume desta região específica do testículo. Aumento 3500x (A e C) e 3000x (B).

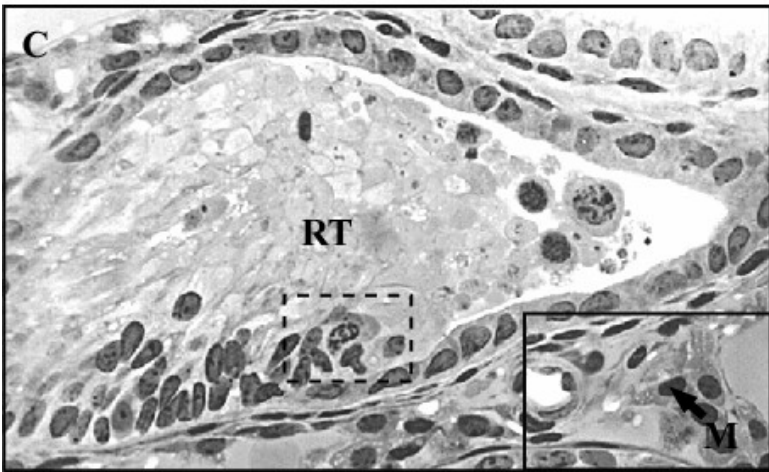
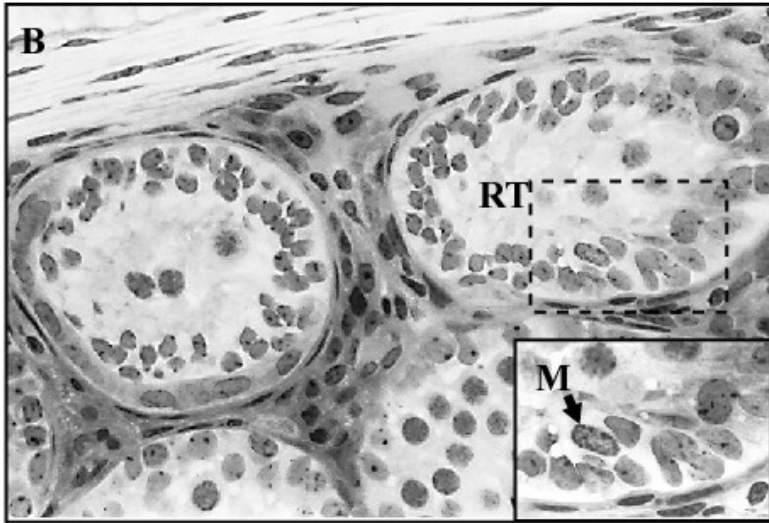
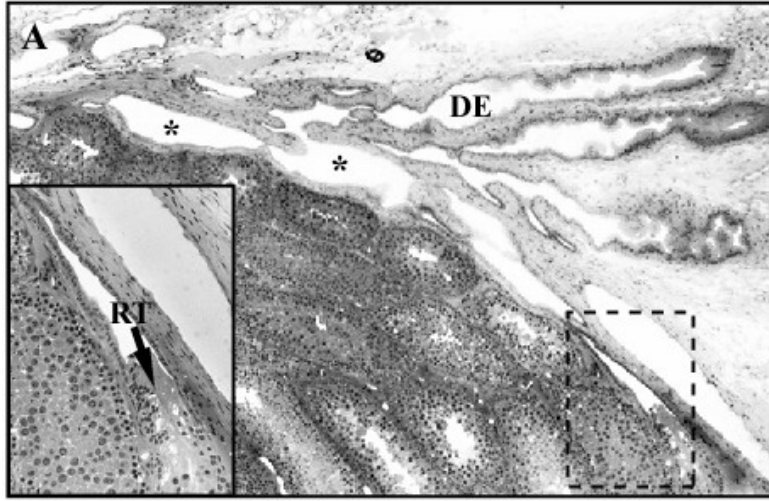


Figura 2 – Região de transição (RT) entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* (*) em testículos de ratos Wistar imaturos e com 36 dias de idade. Observe na Figura A que a região da *rete testis* encontra-se próxima à região dos ductos eferentes (DE) que conectam o testículo ao epidídimo (Aumento de 60x). O destaque da Figura A mostra projeção do epitélio seminífero em direção à *rete testis*. As

Figuras B e C mostram secções de túbulos seminíferos na região de transição com *rete testis* (Aumentos de 200x e 300x, respectivamente). As células de Sertoli dessa região apresentam características de células imaturas, com a eventual presença de núcleo em prófase mitótica (M; em destaque).

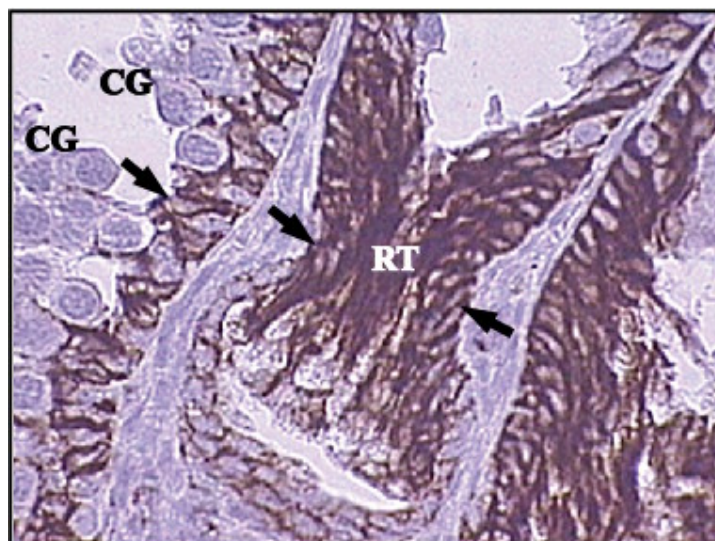


Figura 3 – Região de transição (RT) entre túbulos seminíferos e a *rete testis* de ratos Wistar imaturos e com 28 dias de idade. Observe que as células de Sertoli (setas) desta região apresentam intensa marcação para filamentos intermediários (vimentina). Também merece ser citado que as células germinativas (CG) do túbulo seminífero à direita não apresentam este tipo de filamento. Aumento 1000x.

3.3.2. Animais sacrificados aos 40 dias de idade

A Figura 4 mostra a aparência histológica dos testículos dos ratos controles e tratados, aos 40 dias de idade. Conforme pode ser observado nos testículos dos animais tratados com PTU, provavelmente em decorrência do status mais imaturo das células de Sertoli e da maior incidência de apoptoses de células germinativas, o diâmetro tubular apresenta-se menor.

Os dados biométricos e morfométricos dos animais sacrificados aos 40 dias de idade podem ser observados na Tabela 1. Ao final do tratamento, os animais tratados com PTU apresentaram pesos corporal e testicular cerca

de 1/3 inferiores aos valores obtidos para os animais do grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, não foi observada diferença significativa para o índice gonadossomático entre os dois grupos investigados ($p > 0,05$).

O diâmetro tubular e o volume (mL) dos túbulos seminíferos foram significativamente menores nos animais tratados com PTU ($p < 0,05$). No entanto, o percentual de túbulos seminíferos no parênquima testicular não apresentou diferença significativa entre os dois grupos experimentais investigados ($p > 0,05$). A mesma tendência foi encontrada para o comprimento total de túbulos seminíferos ($p > 0,05$). Apesar do aumento de 17% no número total de células de Sertoli por testículo

observado para os animais tratados com PTU, a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No entanto, o valor obtido para o número de células de Sertoli por

grama de testículo, nos animais tratados com PTU, foi significativamente maior do que no grupo controle ($p < 0,01$).

Tabela 1. Dados biométricos e morfométricos de ratos Wistar controles e tratados com PTU entre 21 e 40 dias de idade e sacrificados aos 40 dias (média \pm erro-padrão).

Parâmetro	Controle (n = 4)	PTU (n = 4)
Peso corporal (g)	138 \pm 4	87 \pm 2*
Peso testicular (mg)	702 \pm 53	471 \pm 40*
Índice gonadossomático (%)	1,01 \pm 0,05	1,09 \pm 0,11
Diâmetro tubular (μ m)	266 \pm 16	221 \pm 7*
Percentual dos túbulos seminíferos (%)	90,5 \pm 0,9	92,1 \pm 1,4
Volume dos túbulos seminíferos (mL)	0,61 \pm 0,06	0,42 \pm 0,04*
Comprimento tubular total (m)	11,1 \pm 0,6	10,9 \pm 0,6
Células de Sertoli por testículo ($\times 10^6$)	34,2 \pm 1,6	39,9 \pm 2,5
Células de Sertoli/grama/testículo ($\times 10^6$)	53,5 \pm 6,4	91,3 \pm 3,5*

N = número de animais. *Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.3.3. Animais adultos

A Figura 5 mostra a histologia do testículo nos animais dos grupos tratado e controle. Conforme pode ser notado, aparentemente não existe nenhuma alteração visível no parênquima testicular dos animais dos dois grupos experimentais.

Os dados biométricos e morfométricos obtidos para os animais sacrificados aos 160 dias de idade estão mostrados na Tabela 2. Conforme pode ser observado nessa tabela, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) para o peso corporal e o índice gonadossomático observados para os animais dos dois grupos experimentais investigados. Por outro lado, o valor encontrado para o peso testicular foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais tratados com PTU durante a fase pré-puberal.

Já os valores obtidos para diâmetro tubular e o percentual ocupado pelos túbulos seminíferos no parênquima testicular foram muito próximos nos animais controles e tratados ($p > 0,05$). Em contraste, os valores encontrados para o volume (mL) e o comprimento total de túbulos seminíferos apresentaram-se significativamente maiores nos animais tratados com PTU ($p < 0,05$). A mesma tendência foi observada para as células de Sertoli, cujo número total por testículo foi quase 20% maior ($p < 0,05$) nos ratos Wistar tratados com PTU. Porém, o número de células de Sertoli por grama de testículo foi semelhante ($p > 0,05$) nos

dois grupos experimentais. Em resumo, as variáveis interdependentes, tais como peso testicular, volume ocupado pelos túbulos seminíferos no parênquima testicular, comprimento total de túbulos seminíferos, número total de células de Sertoli por testículo e produção espermática diária por testículo, apresentaram a mesma tendência, sendo significativamente maiores ($p < 0,05$) nos animais tratados com PTU.

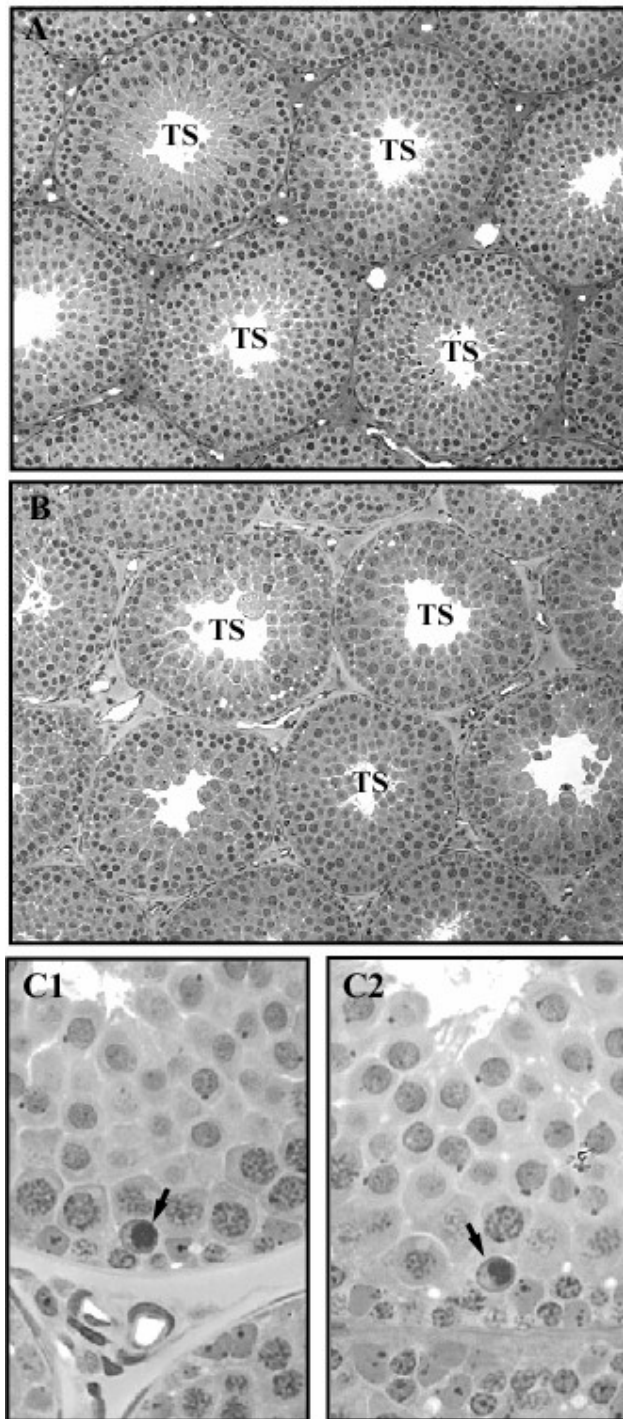


Figura 4 – Secções transversais de túbulos seminíferos (TS) de ratos do grupo controle (A) e tratado com PTU (B), aos 40 dias de idade. Notar que o diâmetro tubular nos animais tratados com PTU apresenta-se menor (B). Células germinativas em apoptose foram freqüentemente observadas (setas) nos ratos tratados com PTU e avaliados aos 40 dias de idade (C1 e C2). Aumento 120x (A e B) e 550x (C1 e C2).

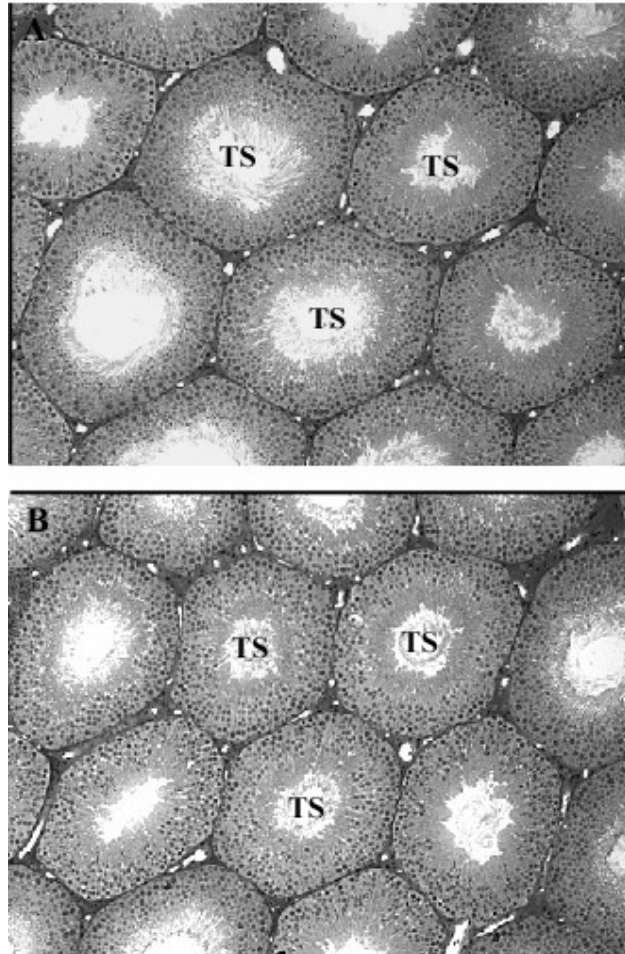


Figura 5 – Secções transversais de túbulos seminíferos (TS) de ratos do grupo controle (A) e tratado com PTU (B), aos 160 dias de idade. Esses túbulos apresentam diâmetro muito próximo. Aparentemente, o processo espermatogênico apresenta-se normal nos animais adultos que foram tratados com PTU antes da puberdade. Aumento 75x.

Tabela 2. Dados biométricos e morfométricos de ratos Wistar controles e tratados com PTU entre 21 e 40 dias de idade e sacrificados aos 160 dias (média \pm erro-padrão).

Parâmetro	Controle (n = 23)	PTU (n = 8)
Peso corporal (g)	397 \pm 15	440 \pm 11
Peso testicular (g)	1,58 \pm 0,03	1,81 \pm 0,03*
Índice gonadossomático (%)	0,80 \pm 0,02	0,82 \pm 0,02
Diâmetro tubular (μ m)	334 \pm 5	336 \pm 2
Percentual dos túbulos seminíferos (%)	89,6 \pm 1,4	89,5 \pm 0,7
Volume dos túbulos seminíferos (mL)	1,32 \pm 0,02	1,51 \pm 0,02*
Comprimento tubular total (m)	15,2 \pm 0,4	17,1 \pm 0,3*
Células de Sertoli por testículo ($\times 10^6$)	36,5 \pm 1,5	42,7 \pm 1,8*
Células de Sertoli/grama/testículo ($\times 10^6$)	24,7 \pm 0,9	25,2 \pm 0,9
Espermátides arredondadas por células de Sertoli	9,2 \pm 0,3	10,0 \pm 0,3
Produção espermática diária por testículo ($\times 10^6$)	25,6 \pm 1,1	32,8 \pm 1,2*
Produção espermática diária/grama/testículo ($\times 10^6$)	17,3 \pm 0,6	19,4 \pm 0,6

N = número de animais. *Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.4. Discussão

3.4.1. Considerações gerais

Nas espécies de mamíferos já investigadas até o presente momento, o período de proliferação pós-natal das células de Sertoli coincide com a proliferação intensa de espermatócitos primários, formação das junções de oclusão da barreira de células de Sertoli (hemato-testicular), secreção de fluido tubular e desenvolvimento do cito-esqueleto dessas células (Russell et al., 1989). Assim, esses eventos são considerados como marcadores morfo-funcionais da diferenciação ou maturação das células de Sertoli (Russell et al., 1989). É considerado ainda que, a partir desse período, esse elemento somático muito importante do testículo não mais se divide (Orth, 1982; França & Russell, 1998; França et al., 2000; França et al., 2005), constituindo, portanto, uma população estável no testículo, uma vez que apoptoses de células de Sertoli adultas são raramente observadas em condições normais (Russell et al., 2001). No entanto, após a puberdade e início da maturidade sexual, apesar de ser observado estabilização no diâmetro tubular e na eficiência das células de Sertoli, o peso do testículo, o comprimento tubular e a produção espermática ainda aumentam significativamente em várias espécies de mamíferos já investigadas (Podany, 1969; Swierstra, 1973; Ekwall et al., 1984; França, 1987; Berndtson & Thompson, 1990; Castro et

al., 1991; Meisami et al., 1992; Russell, 1992; França et al., 2000). Esses dados sugerem fortemente que o número total de células de Sertoli no testículo pode ainda aumentar, além do período no qual as mesmas não apresentariam atividade mitótica.

3.4.2. Análise estrutural e presença de filamentos intermediários na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis*

Estudos ultra-estruturais em mamíferos adultos mostraram que o epitélio da região terminal dos túbulos seminíferos, na transição com a rede testicular, é constituído principalmente por aglomerado de células de Sertoli e algumas espermatogônias (Dym, 1974; Osman & Ploen, 1978; Nykanen, 1980; Wrobel et al., 1982). No entanto, nesses estudos, o grau de maturidade ou diferenciação das células de Sertoli dessa região, bem como a capacidade mitótica dessas células, não foram particularmente investigados.

Durante o desenvolvimento pós-natal dos testículos, as células de Sertoli apresentam características morfológicas e funcionais que denotam o grau de maturação e de diferenciação dessas células (Russell et al., 1989; Gondos & Berndtson, 1993; França & Chiarini-Garcia, 2005). As características morfológicas das mitocôndrias das células de Sertoli também podem diferir nas diferentes espécies de mamíferos (Russell, 1993; Russell and Brinster,

1996; Hess and França, 2005), servindo como marcador morfológico dessas células ou mesmo para distinguir as células de Sertoli das células germinativas que normalmente apresentam mitocôndrias com cristas lamelares (Russell and Brinster, 1996; França et al., 1998). Os resultados inéditos obtidos no presente estudo, através de microscopia eletrônica de transmissão, mostraram que em ratos pré-púberes as células presentes na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* apresentaram características de células de Sertoli imaturas com potencial capacidade de proliferação (Gondos & Berndtson, 1993; França & Chiarini-Garcia, 2005). As mitocôndrias dessas células também possuíam morfologia típica de mitocôndrias de células de Sertoli de ratos (Russell and Brinster, 1996). Os nossos resultados utilizando marcação imunohistoquímica para filamentos intermediários (vimentina) também permitiram demonstrar, através da intensidade de marcação, que as células presentes na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* eram de fato células de Sertoli (Mali et al., 1987; Russell & Griswold, 1993).

Além de permitir visualizar que as células presentes na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* apresentavam características de células de Sertoli imaturas, nossos estudos com microscopia de luz mostraram que essas células eventualmente apresentavam-se em processo de divisão mitótica. No entanto, proporcionalmente, o número de células observadas em mitose foi muito pequeno, sugerindo que o ritmo de proliferação das células de Sertoli nessa região específica do testículo é muito lento. De fato, estudos em andamento no nosso laboratório em ratos pré-púberes, utilizando a timidina triciada como marcador, mostram que células de Sertoli marcadas nessa região são raramente observadas.

3.4.3. Efeitos dos hormônios tireoideanos na proliferação de células de Sertoli presentes na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis*

Os resultados encontrados através de microscopias de luz e eletrônica de transmissão nos permitiram inferir que as células de Sertoli presentes na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* apresentavam capacidade proliferativa por um tempo mais

longo do que seria de se esperar em ratos (Orth, 1982; Almirón & Chemes, 1988). A partir desses resultados nos propusemos investigar se, à semelhança do que ocorre com as células de Sertoli presentes em outros locais do testículo de ratos, a diferenciação das células de Sertoli dessa região específica do testículo é também regulada pelos hormônios tireoideanos (Cooke, 1991; Hess et al., 1993; França et al., 1995; Cooke et al., 2005).

Os resultados encontrados para vários parâmetros biométricos e morfométricos obtidos para os animais controles e tratados e sacrificados aos 40 dias de idade, indicaram que o tratamento com PTU entre 20 e 40 dias de idade foi bastante eficiente. Após o tratamento, o retorno ao estado eutireoídico possibilitou a recuperação do desenvolvimento corporal, conforme pôde ser observado nos ratos tratados e investigados aos 160 dias de idade (Miranda, 2002). Particularmente no que se refere ao grau de maturação das células de Sertoli e atraso na evolução do processo espermatogênico, esses resultados refletiram diretamente no peso testicular e no diâmetro tubular que se apresentaram significativamente menores nos ratos Wistar tratados com PTU. Já o maior número de células germinativas em apoptose, observado nos ratos tratados, pode ser atribuído em parte ao status mais imaturo das células de Sertoli e ao fato das células germinativas, particularmente os espermátócitos primários, apresentarem receptores (TR α 1) para hormônios tireoideanos (Buzzard et al., 2000). Portanto, a maior apoptose de espermátócitos primários em paquítenos deveu-se provavelmente ao hipotireoidismo causado pelo tratamento com a droga PTU. Em consequência do menor número de células germinativas no epitélio seminífero, a densidade de células de Sertoli no parênquima testicular foi bem mais alta resultando em maior número de células de Sertoli por grama de testículo observado nos ratos tratados. Além das alterações observadas devido ao tratamento com PTU, merece ser salientado que o possível efeito do hipotireoidismo em outros elementos do testículo, tais como células de Leydig e células peritubulares mióides, não pode ser descartado (Maran et al., 2001; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2004).

Apesar de ser quase 20% maior, o número total de células de Sertoli por testículo não foi significativamente diferente nos ratos tratados com PTU e sacrificados aos 40 dias de

idade. No entanto, deve ser salientado que o número de animais utilizados nessa idade pode ser considerado pequeno. Além disso, o possível efeito do hipotireoidismo no atraso da maturação das células de Sertoli localizadas na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* pode ter se estendido além dos 40 dias de idade, uma vez que, conforme já foi comentado, a proliferação das células de Sertoli nessa região parece ser muito lenta. Também deve ser considerado que após o encerramento do tratamento com PTU os animais provavelmente ainda permaneceram hipotireoidicos por vários dias (van Haaster et al., 1992), atrasando ainda mais a maturação das células de Sertoli da região de transição. De fato, apesar da magnitude da diferença ser praticamente a mesma entre os animais tratados e controles na idade adulta, entre 40 e 160 dias de idade o número total de células de Sertoli por testículo aumentou ainda ligeiramente e significativamente nos ratos tratados, em comparação com os ratos controles. Esse resultado bastante positivo sugere fortemente que os hormônios tireoideanos são também importantes para a maturação das células de Sertoli localizadas na região de transição. Ainda, em decorrência do maior número de células de Sertoli por testículo, os animais adultos tratados com PTU entre 20 e 40 dias de idade apresentaram maior peso testicular, maior comprimento tubular, maior volume de túbulos seminíferos no testículo e maior produção espermática do que os ratos controles estudados na mesma idade.

O aumento observado para o comprimento tubular provavelmente não ocorreu somente devido ao aumento no número de células de Sertoli nessa região. Pois, o maior número de células de Sertoli propiciaria maior disponibilidade de nichos (Shinohara et al., 2001; Shinohara et al., 2003) que seriam ocupados pelas espermatogônias indiferenciadas localizadas nas proximidades. Assim, após o retorno ao estado eutireoídico e estabelecimento pleno do processo espermatogênico, a proliferação dessas espermatogônias contribuiriam para o maior comprimento total de túbulos seminíferos nos animais tratados. Essa hipótese encontra suporte na literatura a partir de estudos desenvolvidos com transplantados de células germinativas em camundongos mostrando que a disponibilidade de nichos permite que as espermatogônias

prolifere cerca de 70 μm por dia ao longo do túbulo seminífero, mesmo vários meses após o transplante (Nagano et al., 1999).

Em relação ao número de espermátides arredondadas por célula de Sertoli, que é o melhor indicativo da eficiência dessas células (Russell & Peterson, 1984; Orth et al., 1988; Russell et al., 1990; França & Russell, 1998; França et al., 2005), diferentemente do observado por Hess e colaboradores (1993) e Miranda (2002), no presente trabalho o tratamento com PTU não promoveu redução desse parâmetro nos animais adultos. No entanto, nos dois trabalhos acima mencionados o tratamento com PTU foi realizado no período neonatal, proporcionando aumento acentuado do número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo. Portanto, diferente de nosso estudo, redução do número de espermátides arredondadas por célula de Sertoli ocorre particularmente em situações onde elevação acentuada na densidade dessas células no epitélio seminífero é observada (Hess et al., 1993; Miranda, 2002).

Estudos desenvolvidos recentemente mostram que os hormônios tireoideanos agem na diferenciação/maturação das células de Sertoli através das proteínas p21 e p27, que são inibidoras de proliferação celular (Cooke et al., 2005; Holsberger & Cooke, 2005; Holsberger et al., 2005). Corroborando esses resultados, estudos em desenvolvimento em nosso laboratório mostram que as células de Sertoli localizadas na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* apresentam marcação menos intensa para essas proteínas, denotando, assim, o status mais imaturo dessas células e a conseqüente preservação por um período de tempo mais longo da capacidade proliferativa dessas células. No entanto, seria bastante apropriado e estimulante investigar futuramente os mecanismos envolvidos no atraso de maturação e/ou prolongamento da capacidade proliferativa das células de Sertoli localizadas nessa região específica do testículo. Um importante aspecto que talvez deva ser considerado nessas investigações é o fato de que, diferente do testículo que se origina da crista gonadal, a *rete testis* que fica em contato com a região de transição (extremidade distal) dos túbulos seminíferos, se origina de remanescentes do rim primitivo. Portanto, poderia ser considerado, por exemplo, que fatores emanados da *rete testis* poderiam regular

funcionalmente as células de Sertoli situadas nas proximidades da mesma.

3.5. Referências bibliográficas

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anatomical Record*, v.94, p.238-248, 1946.

ALMIRON, I.; CHEMES, H. Spermatogenic onset. II. FSH modulates mitotic activity of germ and Sertoli cells in immature rats. *International Journal of Andrology*, v.11, n.3, p.235-246, 1988.

AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls: III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *American Journal of Anatomy*, v.110, p.49-67, 1962.

ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, v.8, n.3, p.219-241, 1963.

BERNDTSON, W.E.; THOMPSON, T.L. Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *Journal of Andrology*, v.11, n.5, p.429-435, 1990.

BUZZARD, J.J.; MORRISON, J.R.; O'BRYAN, M.K. et al. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of Reproduction*, v.62, n.3, p.664-669, 2000.

CASTRO, A.C.S.; CARDOSO, F.M.; FRANÇA, L.R. Effects of puberty and sexual development on daily sperm production and epididymal sperm reserves on Piau boars. *Animal Reproduction Science*, v.25, p.83-90, 1991.

COOKE, P.S. Thyroid hormones and testis development: a model system for increasing testis growth and sperm production. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.637, p.122-132, 1991.

COOKE, P.S.; HOLSBERGER, D.R.; FRANÇA, L.R. Thyroid hormone regulation of

Sertoli cell development. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D., (Ed.). *Sertoli cell biology*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2005. p.217-226.

DORTS, V.J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. *Monatsh Veterinarmed*, v.29, n.17, p.650-652, 1974.

DYM, M. The fine structure of monkey Sertoli cells in the transitional zone at the junction of the seminiferous tubules with the tubuli recti. *American Journal of Anatomy*, v.140, n.1, p.1-25, 1974.

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

FRANÇA, L.R. Desenvolvimento testicular de suínos da raça Piau, do nascimento aos 12 meses de idade. *Dissertação (Mestrado)*, Belo Horizonte, UFMG – Instituto de Ciências Biológicas, 1987. 78p.

FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. *Tese (Doutorado)*, Belo Horizonte, UFMG – Instituto de Ciências Biológicas, 1991. 185p.

FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION (ICAR), 12, 1992, Netherlands, *Resumos*. Netherlands: The Hague, 1992. p.1716-1718.

FRANCA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.300-318, 2005.

FRANCA, L.R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B., (Ed.). *A Célula: Uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Ed. Manole, 2005. v.01, p.302-324.

FRANCA, L.R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R. et al. Germ cell genotype controls cell

cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of Reproduction*, v.59, n.6, p.1371-1377, 1998.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTÍNEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J., (Ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. España: Churchill Communications Europe España, 1998. p.197-219.

FRANÇA, L.R.; SILVA JR., V.A.; CHIARINI-GARCIA, H. et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, v.63, n.6, p.1629-1636, 2000.

GONDOS, B.; BERNDSTON, W. Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL, L.; GRISWOLD, M., (Ed.). *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press, 1993. p.115-154.

HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D. et al. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology*, v.132, n.6, p.2607-2613, 1993.

HESS, R.A.; FRANCA, L.R. Structure of the Sertoli cell. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D., (Ed.). *Sertoli cell biology*. New York: Elsevier Academic Press, 2005. p.19-40.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, n.2, p.209-213, 1978.

HOLSBERGER, D.R.; BUCHOLD, G.M.; LEAL, M.C. et al. Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biology of Reproduction*, v.72, n.6, p.1429-1436, 2005.

HOLSBERGER, D.R.; COOKE, P.S. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell and Tissue Research*, v.322, n.1, p.133-140, 2005.

JOHNSON, L.; THOMPSON, D.L., JR. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum

concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biology of Reproduction*, v.29, n.3, p.777-789, 1983.

LANGFORD, L.A.; COGGESHALL, R.E. The use of potassium ferricyanide in neural fixation. *Anatomical Record*, v.197, n.3, p.297-303, 1980.

MALI, P.; VIRTANEN, I.; PARVINEN, M. Vimentin expression in spermatogenic and Sertoli cells is stage-related in rat seminiferous epithelium. *Andrologia*, v.19, n.6, p.644-653, 1987.

MARAN, R.R.; RAVICHANDRAN, K.; ARUNAKARAN, J. et al. Impact of neonatal hypothyroidism on Leydig cell number, plasma, and testicular interstitial fluid sex steroids concentration. *Endocrine Research*, v.27, n.1-2, p.119-141, 2001.

MEISAMI, E.; SENDERA, T.J.; CLAY, L.B. Paradoxical hypertrophy and plasticity of the testis in rats recovering from early thyroid deficiency: a growth study including effects of age and duration of hypothyroidism. *Journal of Endocrinology*, v.135, n.3, p.495-505, 1992.

MENDIS-HANDAGAMA, C.; ARIYARATNE, S. Prolonged and transient neonatal hypothyroidism on Leydig cell differentiation in the postnatal rat testis. *Archives of Andrology*, v.50, n.5, p.347-357, 2004.

MIRANDA, J.R. Efeitos do tratamento neonatal com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) e FSH na proliferação das células de Sertoli e função testicular em ratos Wistar adultos. *Dissertação (Mestrado)*, Belo Horizonte, UFMG - Escola de Veterinária, 2002. 47p.

NAGANO, M.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biology of Reproduction*, v.60, n.6, p.1429-1436, 1999.

NYKANEN, M. On the microscopic anatomy of the rete testis a scanning electron microscopic and light microscopic study. *International Journal of Andrology*, v.3, n.4, p.383-395, 1980.

- ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anatomical Record*, v.203, n.4, p.485-492, 1982.
- ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v.122, n.3, p.787-794, 1988.
- OSMAN, D.I.; PLOEN, L. The mammalian tubuli recti: ultrastructural study. *Anatomical Record*, v.192, n.1, p.1-17, 1978.
- PEASE, D.C. *Histological techniques for electron microscopy*. 2 ed. New York: Academic Press, 1964. 381p.
- PODANY, J. Testicular biometry in boars. *Acta Veterinaria (Belgrade)*, v.38, p.215-221, 1969.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v.17, p.208-212, 1963.
- RUSSELL, L.D. Normal development of the testis. In: MOHR, U.; DUNGWORTH, D.L.; CAPEN, C.C., (Ed.). *Pathobiology of the aging rat*. Washington: ILSI Press, 1992. v.1, p.395-405.
- RUSSELL, L.D. Form, dimensions, and cytology of mammalian Sertoli cells. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D., (Ed.). *The Sertoli cell*. Clearwater: Cache River Press, 1993. p.1-37.
- RUSSELL, L.D.; BARTKE, A.; GOH, J.C. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *American Journal of Anatomy*, v.184, n.3, p.179-189, 1989.
- RUSSELL, L.D.; BRINSTER, R.L. Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *Journal of Andrology*, v.17, n.6, p.615-627, 1996.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P. et al. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. 1. Clearwater, Fla.: Cache River Press, 1990. 286p.
- RUSSELL, L.D.; FRANCA, L.R. Building a testis. *Tissue and Cell*, v.27, n.2, p.129-147, 1995.
- RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D., (Eds.) *The Sertoli cell*. 1 ed. Clearwater: Cache River Press, 1993. 799p.
- RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.70, n.2, p.635-641, 1984.
- RUSSELL, L.D.; WARREN, J.; DEBELJUK, L. et al. Spermatogenesis in Bclw-deficient mice. *Biology of Reproduction*, v.65, n.1, p.318-332, 2001.
- SCHULZ, R.W.; MENTING, S.; BOGERD, J. et al. Sertoli cell proliferation in the adult testis-evidence from two fish species belonging to different orders. *Biology of Reproduction*, v.73, n.5, p.891-898, 2005.
- SHINOHARA, T.; ORWIG, K.E.; AVARBOCK, M.R. et al. Remodeling of the postnatal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, n.11, p.6186-6191, 2001.
- SHINOHARA, T.; ORWIG, K.E.; AVARBOCK, M.R. et al. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation. *Biology of Reproduction*, v.68, n.3, p.1064-1071, 2003.
- SPRANDO, R.L. Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. In: RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIN, A.P.; CLEGG, E.D., (Ed.). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press, 1990. p.277-280.

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

TARULLI, G.A.; STANTON, P.G.; LERCHL, A. et al. Adult sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: effect of FSH on proliferation and junction protein organization. *Biology of Reproduction*, v.74, n.5, p.798-806, 2006.

VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R. et al. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology*, v.131, n.3, p.1574-1576, 1992.

VOELZ, H.; DWORKIN, M. Fine structure of *Myxococcus xanthus* during morphogenesis. *Journal of Bacteriology*, v.84, p.943-952, 1962.

WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, v.4, n.4, p.475-478, 1958.

WROBEL, K.H.; SINOWATZ, F.; MADEMANN, R. The fine structure of the terminal segment of the bovine seminiferous tubule. *Cell and Tissue Research*, v.225, n.1, p.29-44, 1982.

4. CAPÍTULO III

ESTRUTURA E FUNÇÃO TESTICULARES EM RATOS HIPERADIPOSOS NÃO-GENÉTICOS PRÉ-PÚBERES E ADULTOS: EFEITOS DA INDUÇÃO PÓS-NATAL DA HIPERLEPTINEMIA NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI

RESUMO

Há pouca informação disponível na literatura sobre os níveis hormonais, estrutura e função testiculares durante o desenvolvimento pós-natal de ratos tratados logo após o nascimento com glutamato monossódico (MSG). No presente trabalho, ratos machos recém-nascidos receberam injeções com MSG (4 mg/g de peso corporal) a cada 2 dias até os 10 dias de idade, sendo avaliados nas fases pré-puberal e adulta. Os níveis plasmáticos de leptina, LH, FSH, prolactina, testosterona (T), corticosterona e tiroxina livre (FT₄) foram avaliados. Os animais tratados com MSG apresentaram concentrações plasmáticas elevadas de corticosterona e hiperadiposidade/hiperleptinemia, independentemente da idade avaliada. No entanto, os níveis de prolactina não foram afetados. Além disso, ratos pré-púberes revelaram redução significativa ($p < 0,05$) no peso testicular e no número de células de Sertoli (CS) e de Leydig (CL) por testículo. Os níveis plasmáticos de leptina apresentaram-se elevados (2,41 vs. 8,07; $p < 0,05$) nos ratos tratados com MSG avaliados na fase pré-puberal, e tais animais mostraram níveis plasmáticos de LH, FSH, T e FT₄ expressivamente diminuídos. Essas informações indicam que o desenvolvimento do testículo, assim como a proliferação de CS e CL, apresentaram alterações nos animais tratados com MSG e avaliados na fase pré-puberal. Ratos tratados com MSG e avaliados na fase adulta também mostraram níveis plasmáticos de leptina expressivamente mais altos (7,26 vs. 27,04; $p < 0,05$), ao passo que os níveis plasmáticos de LH e FSH apresentaram-se reduzidos ($p < 0,05$). Entretanto, os níveis plasmáticos de T e FT₄ estavam normais, e nenhuma alteração aparente foi observada na estrutura do testículo dos animais tratados com MSG. Apenas o número de CS por testículo apresentou-se reduzido significativamente ($p < 0,05$) nos animais adultos tratados com MSG. Dessa forma, apesar do fenótipo hiperadiposidade/hiperleptinemia aplicado no período neonatal ter sido provavelmente o responsável pelos danos do eixo reprodutivo em animais tratados com MSG, ainda precisa ser investigado se tal condição é o fator principal da disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em ratos tratados com MSG.

PALAVRAS-CHAVE: Rato, leptina, testículo, morfometria, célula de Sertoli, célula de Leydig, espermatogênese, hormônios

TESTIS STRUCTURE AND FUNCTION IN A NONGENETIC HYPERADIPOSE RAT MODEL AT PREPUBERTAL AND ADULT AGES

ABSTRACT

There are few data for hormonal levels and testis structure and function during postnatal development in rats neonatally treated with monosodium L-glutamate (MSG). In our study, newborn male pups were ip injected with MSG (4 mg/g body weight) every 2 d up to 10 d of age and investigated at prepubertal and adult ages. Plasma levels of leptin, LH, FSH, prolactin, testosterone (T), corticosterone, and free T4 (FT₄) were measured. MSG rats displayed elevated circulating levels of corticosterone and hyperadiposity/hyperleptinemia, regardless of the age examined; conversely, circulating prolactin levels were not affected. Moreover, prepubertal MSG rats revealed a significant ($P < 0.05$) reduction in testis weight and the number of Sertoli (SC) and Leydig cells per testis. Leptin plasma levels were severalfold higher (2.41 vs. 8.07; $P < 0.05$) in prepubertal MSG rats, and these animals displayed plasma LH, FSH, T, and FT₄ levels significantly decreased ($P < 0.05$). Taken together, these data indicate that testis development, as well as SC and Leydig cell proliferation, were disturbed in prepubertal MSG rats. Adult MSG rats also displayed significantly higher leptin plasma levels (7.26 vs. 27.04; $P < 0.05$) and lower ($P < 0.05$) LH and FSH plasma levels. However, T and FT₄ plasma levels were normal, and no apparent alterations were observed in testis structure of MSG rats. Only the number of SCs per testis was significantly ($P < 0.05$) reduced in the adult MSG rats. In conclusion, although early installed hyperadipose/hyperleptinemia phenotype was probably responsible for the reproductive axis damages in

MSG animals, it remains to be investigated whether this condition is the main factor for hypothalamus-pituitary-gonadal axis dysfunction in MSG rats.

KEY-WORDS: Rat, leptin, testis, morphometry, Sertoli cell, Leydig cell, spermatogenesis, hormones

4.1. Introdução

O peptídeo leptina, derivado do tecido adiposo, demonstrou ser importante para o controle da ingestão de alimentos, do metabolismo de energia e da função reprodutiva (Barash et al., 1996; Magni et al., 2000; Caprio et al., 2001; Smith et al., 2002), independente do sexo dos indivíduos. Este peptídeo é o produto do gene *ob*, controlado pelo fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), o qual é composto por 145 resíduos de aminoácidos e peso molecular de ~16 kDa (McGregor et al., 1996). Vários trabalhos descreveram o envolvimento da leptina na maturação sexual normal e no processo reprodutivo (Barash et al., 1996; Garcia-Mayor et al., 1997). Além disso, foi mostrado que a leptina é um regulador metabólico vital da função reprodutiva, sendo um sinal entre a condição nutricional e a reprodução (Smith et al., 2002).

O receptor de leptina está expresso em, pelo menos, seis isoformas (a-f) surgindo da união de variantes de mRNA (Tartaglia et al., 1995). A variante biologicamente ativa do receptor de leptina (Ob-Rb) está localizada nos núcleos arqueados (ARC) e ventromediais (VMN) do hipotálamo. Igualmente, a expressão e a localização do receptor de leptina foram mostradas em gonadotrofos (Sone et al., 2001), células de Leydig (Caprio et al., 1999) e células da linhagem espermatogênica (El-Hefnawy et al., 2000). No testículo de camundongos foi evidenciado que a leptina atravessa a barreira hematotesticular em um processo não-saturável (Banks et al., 1999). Outros autores encontraram receptores de leptina nesse órgão, sendo a isoforma Ob-Rb a variante expressa predominante. Também foi mostrado que Ob-Rf é uma isoforma solúvel, a qual funciona como uma proteína circulante transportadora de leptina (Lahlou et al., 2000). Inclusive, Bjorbaek & Kahn (2004) descreveram um sistema de transporte saturável para a leptina ao nível do sistema nervoso central.

Foi proposto que uma estreita e específica faixa de concentração de leptina é necessária para manter a função reprodutiva normal. Níveis superiores ou inferiores a estes limiares são críticos para a influência da leptina

na função do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) (Caprio et al., 2001; Smith et al., 2002). Assim, apesar de camundongos machos deficientes em leptina (*ob/ob*) apresentarem-se inférteis, tal condição pode ser revertida com a administração deste peptídeo (Mounzih et al., 1997).

A administração neonatal de glutamato monossódico (MSG) em roedores danifica o núcleo arqueado, resultando assim em uma síndrome caracterizada por crescimento retardado, hiperadiposidade e hipogonadismo durante a idade adulta (Redding et al., 1971; Spinedi et al., 1984). Entretanto, de acordo com o nosso conhecimento, existe pouca informação na literatura a respeito dos níveis plasmáticos dos variados hormônios secretados pelos gonadotrofos em camundongos nas idades adulta e pré-puberal danificados pelo glutamato monossódico (Rush, 1986). Também, nenhum dado relacionado às mudanças na estrutura e na função do trato reprodutivo masculino durante o desenvolvimento pós-natal foi relatado em camundongos lesados com MSG. Estudo recente mostrou que a hiperleptinemia endógena, causada pelo tratamento com glutamato monossódico, é capaz de modificar a atividade esteroideogênica testicular e a expressão do receptor de leptina das células de Leydig em camundongos adultos (Giovambattista et al., 2003). Desta forma, apesar dos efeitos neurotóxicos do MSG terem sido relativamente bem estudados, para o nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro estudo a executar uma investigação detalhada sobre o impacto do tratamento neonatal com MSG no desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, tendo como base a avaliação feita a partir de parâmetros relacionados à estrutura e atividade do testículo, em associação a diversos marcadores da função reprodutiva.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Animais, tratamento e colheita de material

Ratos adultos Sprague-Dawley machos (entre 350-450g) e fêmeas (entre 240-280g) foram dispostos em gaiolas para o acasalamento, sendo mantidos em temperatura

controlada (20-22°C) e 12 horas diárias de luminosidade. Água e ração peletizada foram disponibilizadas *ad libitum*. As ratas gestantes foram colocadas em gaiolas individuais de plástico transparente.

Filhotes machos, 2 dias após o nascimento, foram injetados intraperitonealmente com 4 mg/g de peso corporal com glutamato monossódico (Merck, Darmstadt, Alemanha) dissolvido em 0,9% NaCl ou o mesmo volume de 10 % NaCl (controle) a cada 2 dias, até o décimo dia de idade (Giovambattista et al., 2003). Estes animais foram desmamados aos 21 dias de idade, sendo sacrificados com 1 ou 4 meses de idade (n = 9-10 ratos por grupo/idade).

Amostras de sangue foram coletadas antes da perfusão, através de punção cardíaca, sendo as amostras de plasma mantidas congeladas (- 20°C) até a dosagem dos diferentes hormônios [leptina, FSH, LH, prolactina, corticosterona, testosterona (T), e tiroxina livre (FT₄)]. O processamento dos testículos para análise histológica foi realizado de acordo com Russell et al. (1990). Quinze minutos antes de iniciar a perfusão para a fixação do tecido, os animais foram injetados intraperitonealmente com 130 UI/kg de peso corporal de heparina. Em seguida, os animais foram anestesiados (quetamina-xilazina), perfundidos através do ventrículo esquerdo com 0,9 % NaCl (~5 min) para limpeza dos vasos sanguíneos. Após esta etapa, os mesmos foram fixados com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,2, durante 25-30 minutos, sendo posteriormente retirados e pesados os testículos, epidídimos, vesícula seminal, além de glândula de coagulação e glândulas adrenais. Para a análise à microscopia óptica, fragmentos do testículo foram rotineiramente processados e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, Leica). Subseqüentemente, secções de 4 µm de espessura foram obtidas e coradas com azul de toluidina. Imediatamente após o sacrifício, depósitos de gordura (a soma de omental, epididimal e retroperitoneal) dos animais em ambos os grupos e idades foram retirados, dissecados e pesados.

4.2.2. Dosagens Hormonais

Concentrações plasmáticas de leptina foram obtidas por radioimunoensaio (RIA) específico, desenvolvido e validado para leptina

de ratos (Giovambattista et al., 2000). Resumidamente, leptina murina (PrePro Tech, Inc., mleptina) sintética foi usada para ambos, peptídeos marcados e comuns, assim como para o desenvolvimento de soro antileptina. A leptina foi marcada com ¹²⁵I-Na (atividade específica de 15 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido) pelo método de cloramina-T e purificada por eluição após adição da mistura de radio-iodação de Sephacryl S-300 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (1,5 x 60 cm) balanceada com fosfato de sódio (0,05 M)-BSA (2 g/L) - solução sódica (10 mg/L) (pH 7,4). O soro antileptina foi desenvolvido com a imunização de coelhos com leptina murina (PrePro Tech) em associação com BSA. O raio de detecção da curva padrão foi de 0,4-50 ng/mL. Desconhecidos ou padrões (200 µL) foram incubados durante a noite em temperatura ambiente na presença de 50 µL de soro de coelho antileptina (diluição final 1:15000) e 50 µL (aproximadamente 30000 cpm) de contraste. A separação das frações limites e livres foi conseguida ao adicionar, primeiramente, 200 µL de solução salina normal contendo γ-globulin anticoelho, e depois 500 µL de solução polietileno glicol 6000 (10% wt/vol, em salinidade normal), depois incubada por 30 minutos a 4°C até a centrifugação (40 min a 4°C, 4000 rpm). Partículas flutuantes foram aspiradas e o limite radioativo foi medido. O ensaio mostrou 2% e 0% de reatividade-cruzada com a leptina humana e hormônios hipofisários (LH, FSH, GH, PRL) de ratos/camundongos, respectivamente. Os coeficientes de variação do intra-ensaio e inter-ensaio foram 5-8 e 10-13%, respectivamente.

Os níveis sorológicos de LH, FSH e prolactina foram determinados por RIAs de anticorpos duplos (Suescun et al., 1994). Os resultados estão expressos em termos de preparações de referência (LH-RP3, FSH-RP-2 e PRL-RP-3 de ratos), fornecido pelo National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (Bethesda, MD). As sensibilidades para os ensaios foram: LH, 0,024 ng/tubo; FSH, 0,10 ng/tubo e prolactina, 0,05 ng/tubo. Os coeficientes de variação do intra-ensaio e inter-ensaio foram menores que 8% e 13%, respectivamente, independente do ensaio. Os níveis de T no plasma foram medidos por RIA usando Testosterona [1,2-³H (N), 60 Ci/mmol] from New England Nuclear (Boston, (MA) Mass., USA) e um anticorpo específico de

Immunotech Diagnostic (Montreal, Canada), como previamente descrito e validado (Suescun et al., 1985). A sensibilidade do ensaio de testosterona foi 12,5 pg/mL. Os coeficientes de variação do intra-ensaio e inter-ensaio foram menores que 12%. As concentrações plasmáticas de corticosterona foram avaliadas por um RIA específico (Giovambattista et al., 2000). A curva padrão variou entre 1 e 250 µg/dL, e CVs intra- e inter-ensaio foram 5% e 9% respectivamente. Os níveis de FT₄ no soro também foram analisados por RIA usando um kit comercial da Diagnostic Product Corp. (USA) e validado para amostras de plasma de camundongos. Os coeficientes de variação do intra-ensaio e inter-ensaio foram 4,5 e 8%, respectivamente.

4.2.3. Histologia e morfometria do testículo

A análise histológica qualitativa do testículo foi realizada para identificar qual a célula da linhagem espermatogênica mais avançada presente no epitélio seminífero de cada animal com 30 dias de idade, de acordo com critério estabelecido por Russell et al. (1990) para caracterização de estádios do ciclo do epitélio seminífero de ratos pelo sistema acrossômico. Células germinativas em apoptose foram caracterizadas como células com núcleos e citoplasma escuros e membrana plasmática enrugada. Estas características apoptóticas das células germinativas são facilmente reconhecíveis no corte histológico fixado com glutaraldeído e incluído em resina plástica, sendo tal abordagem metodológica amplamente validada na literatura (Russell et al., 1990; Russell et al., 1993).

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido em aumento aproximado de 200x, a partir da mensuração ao acaso de pelo menos 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. As densidades volumétricas de vários componentes do parênquima testicular foram estimadas utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos) adaptado a uma das oculares do microscópio de luz, em aumento de 400x. Para cada animal foram analisados 15 campos, escolhidos ao acaso, perfazendo-se um total de 6615 pontos. Artefatos raramente foram vistos e não foram considerados no número total de pontos utilizados para obter as densidades volumétricas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: túbulo seminífero, compreendido de

túnica própria, epitélio e lume, células germinativas em apoptose, células de Leydig, vasos linfáticos e sanguíneos e tecido conjuntivo. O volume (mL) de cada componente testicular avaliado foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo. Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,03 a 1,04; França, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. Para obtenção de uma avaliação mais precisa do volume do testículo, a túnica albugínea (~3,4% com 30 dias de idade e ~6,5% com 120 dias de idade) foi excluída do peso do testículo. O comprimento total dos túbulos seminíferos (metros) foi estimado dividindo-se o volume do túbulo seminífero pelo raio ao quadrado (R^2) dos túbulos seminíferos multiplicado pelo valor π .

4.2.4. Contagem celular

Nucléolos de células de Sertoli foram contados em 10 secções de túbulos seminíferos as mais arredondadas possíveis, escolhidas ao acaso para cada animal. Os valores obtidos foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962). Para tal propósito, dez diâmetros nucleolares foram medidos para cada animal. O número total de células de Sertoli por testículo foi estimado a partir do número corrigido de nucléolos/núcleos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo fórmula empregada por Hochereau-De Reviers & Lincoln (1978). A estimativa da produção espermática diária (PED) foi feita de acordo com França (1992), utilizando-se a seguinte fórmula: $PED = \text{Número total de células de Sertoli por testículo} \times \text{ICS} \times \text{frequência do estágio VII (\%)} / \text{Duração do estágio VII (dias)}$, onde ICS = número de espermátides arredondadas por célula de Sertoli no estágio VII.

O volume individual das células de Leydig foi obtido a partir do volume de núcleo e a proporção entre o núcleo e citoplasma. O volume do núcleo foi obtido utilizando-se a média do diâmetro nuclear, tendo sido avaliados 30 diâmetros nucleares para cada animal. O volume nuclear individual obtido foi expresso

em (μm^3), utilizando-se a fórmula $4/3\pi R^3$, onde R = diâmetro nuclear/2. Para calcular a proporção entre núcleo e citoplasma, foi utilizado retículo com 441 interseções (pontos), em aumento de 400x. Aproximadamente mil pontos sobre células de Leydig foram contados para cada animal. O número de células de Leydig por testículo foi estimado a partir do volume individual e do volume total ocupado por estas células no testículo.

4.2.5. Análise estatística

Os dados referentes aos valores hormonais (média \pm erro padrão) foram submetidos à análise de variância (idade x tratamento), seguido pelo teste de Fisher para a comparação de valores médios diferentes (Zar, 1974). Os dados morfométricos estão expressos como média \pm erro padrão, tendo sido analisados pelo teste t de Student. As análises foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA 3.11 (StatSoft, Inc., Oklahoma, USA, 1995). Para a análise estatística das proporções volumétricas, os dados foram submetidos à transformação angular. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4.3. Resultados

4.3.1. Efeitos do tratamento neonatal com MSG na morfologia do testículo e nos mecanismos endócrinos em ratos machos com 30 dias de idade.

Os resultados dos parâmetros morfométricos e biométricos encontrados nos ratos tratados com MSG e controles estão mostrados na Tabela 1 e Figura 1, sendo os resultados obtidos para os níveis hormonais apresentados na Tabela 2. Como mostrado na Tabela 1, animais tratados com MSG mostraram redução significativa ($p < 0,05$) no peso corporal, índice gonadossomático (peso testicular dividido pelo peso corporal) e pesos testiculares, epididimários e da glândula adrenal. Similarmente, estes animais apresentaram redução no diâmetro tubular ($p < 0,05$), volume de túbulos seminíferos, comprimento total de túbulos seminíferos, porcentagem e volume do lume dos túbulos seminíferos, volume nuclear das células de Leydig e número total de células de Leydig e Sertoli por testículo (Figura 1).

A análise qualitativa dos túbulos seminíferos mostrou que o ritmo do desenvolvimento das células germinativas foi ligeiramente atrasado nos animais tratados. A este respeito, como mostrado na Figura 2, as células germinativas mais avançadas nos animais controle foi espermatíde alongada na fase 16, ao passo que nos animais hiperleptinêmicos tais células encontravam-se na fase 9. Em contrapartida ao observado no grupo controle, no qual células germinativas em apoptose raramente foram observadas, a porcentagem do epitélio seminífero ocupado por estas células foi de 0,5% nos animais tratados (Figura 2). Entretanto, a morfologia das células de Leydig, verificadas à microscopia óptica, estava aparentemente normal em ambos os grupos analisados (Figura 3). As células de Sertoli aparentavam-se ligeiramente menos maduras, apresentando redução significativa no diâmetro dos nucléolos (1,95 vs. 1,86; $p < 0,05$) nos animais tratados com MSG.

A quantidade de gordura foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos ratos tratados com MSG quando comparados ao grupo controle (Tabela 1). Apesar dos valores obtidos para os níveis plasmáticos de prolactina nos animais tratados com MSG representarem apenas ~40 % dos valores observados para o grupo controle, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Em relação às dosagens hormonais avaliadas (Tabela 2), enquanto os níveis de leptina e corticosterona foram 3,5 e 2,5 vezes mais altos, respectivamente ($p < 0,05$), nos animais tratados com MSG do que nos animais controle, inversamente, os níveis de LH, FSH, T e FT_4 apresentavam-se significativamente mais baixos ($p < 0,05$).

Tabela 1. Dados biométricos e morfométricos de ratos controle e tratados com glutamato monossódico (MSG), sacrificados aos 30 dias de idade (n = 9-10 ratos por grupo; média ± erro padrão).

Parâmetro	Controle	MSG
Peso corporal (g)	114 ± 5	92 ± 3*
Depósitos de gordura (g/100g de peso corporal)	0,51 ± 0,06	1,41 ± 0,10*
Peso testicular (mg) ¹	400 ± 30	230 ± 20*
Peso líquido do testículo (mg) ²	386 ± 29	222 ± 29*
Índice gonadossomático (%)	0,71 ± 0,03	0,50 ± 0,04*
Peso epididimário (mg) ¹	46,8 ± 3,5	32,3 ± 1,9*
Peso da glândula adrenal (mg) ¹	14,3 ± 0,7	11,2 ± 0,5*
Comprimento tubular total (m)	11,0 ± 0,5	7,4 ± 0,5*
Percentual de túbulos seminíferos (%)	90 ± 0,9	88,1 ± 0,6
Volume tubular (µL)	352 ± 20	194 ± 16*
Percentual de lumen (%)	3,4 ± 0,4	2,5 ± 0,2*
Volume de lumen (µL)	14 ± 2	6 ± 1*
Percentual de células germinativas em apoptose (%)	0,0	0,5 ± 0,1*
Diâmetro tubular (µm)	202 ± 3	182 ± 5*
Célula de Leydig:		
Percentual no testículo (%)	3,2 ± 0,3	3,3 ± 0,2
Volume no parênquima testicular (µL)	13,0 ± 1,8	7,2 ± 0,6*
Diâmetro nuclear (µm)	7,2 ± 0,1	6,8 ± 0,06*
Volume individual (µm ³)	819 ± 34	761 ± 25
Volume citoplasmático (µm ³)	622 ± 25	599 ± 22
Volume nuclear (µm ³)	197 ± 10	163 ± 4*

* Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05). ¹Média de peso dos órgãos direito e esquerdo. ²Peso testicular menos peso da túnica albugínea.

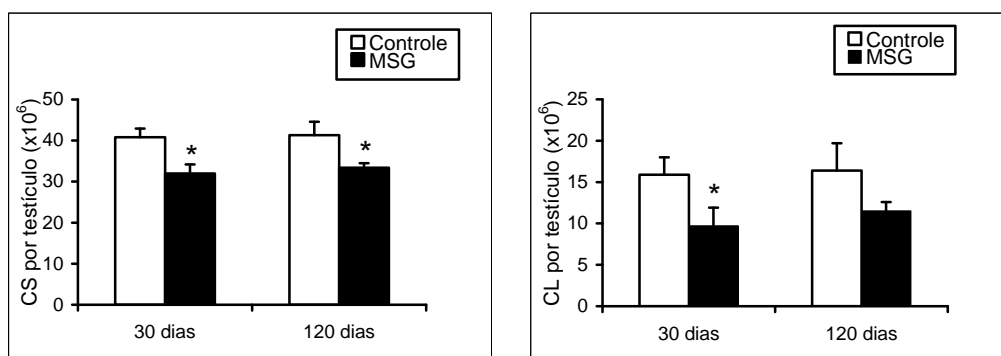


Figura 1. Número total de células de Sertoli (CS) e células de Leydig (CL) por testículo em ratos Sprague-Dawley aos 30 e 120 dias de idade. Observe que na idade pré-puberal o número de células de Sertoli (A) e células de Leydig (B) por testículo apresenta-se significativamente menor (p < 0,05) nos animais tratados com MSG. O número encontrado para CS e CL para os animais do grupo controle e tratados com MSG foram similares em ambas as idades investigadas. No entanto, somente os resultados obtidos para CS foram significativamente diferentes (*, p < 0,05) para os animais adultos.

Tabela 2. Concentrações hormonais plasmáticas em ratos controle e tratados com glutamato monossódico (MSG), sacrificados aos 30 dias de idade (n = 9-10 ratos por grupo; média ± erro padrão).

Parâmetro	Controle	MSG
Leptina (ng/mL)	2,41 ± 0,34	8,07 ± 2,19*
Prolactina (ng/mL)	6,79 ± 2,48	2,64 ± 0,58
FSH (ng/mL)	6,96 ± 0,19	3,10 ± 0,29*
LH (ng/mL)	0,31 ± 0,07	0,15 ± 0,02*
FT ₄ (ng/dL)	1,16 ± 0,05	0,76 ± 0,006*
Testosterona (ng/mL)	3,32 ± 0,47	2,63 ± 0,16*
Corticoesterona (µg/dl)	1,84 ± 0,51	4,54 ± 0,97*

* Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

4.3.2. Estrutura e função do testículo e demais características fenotípicas de ratos tratados com MSG adultos

Diversas características fenotípicas de ratos adultos, tratados com MSG e controles, são mostradas na Tabela 3 e na Figura 1. Ratos adultos hiperleptinêmicos apresentaram redução significativa (p < 0,05) no peso corporal e nos pesos do epidídimo, vesícula seminal mais glândula de coagulação e glândula adrenal. Nenhuma alteração histológica aparente foi observada nos túbulos seminíferos e compartimentos intertubulares do testículo (Figura 4). Entretanto, similar ao observado nos ratos com um mês de idade, estudos detalhados demonstraram que o número de células Sertoli por testículo foi ~20 % menor (p < 0,05) nos animais hiperleptinêmicos (Figura 1). Apesar de não significativo, tendência clara de diminuição foi observada para peso do testículo, volume individual de células de Leydig, número de células de Leydig por testículo (Figura 1) e produção espermática diária por testículo nos animais tratados com MSG. Entretanto, resultados semelhantes foram encontrados para a maioria dos parâmetros testiculares nos animais tratados com MSG e controle, tais como altura do epitélio seminífero, volume do lume, número de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero e eficiência das células de Sertoli (número de espermátides arredondadas por célula de Sertoli).

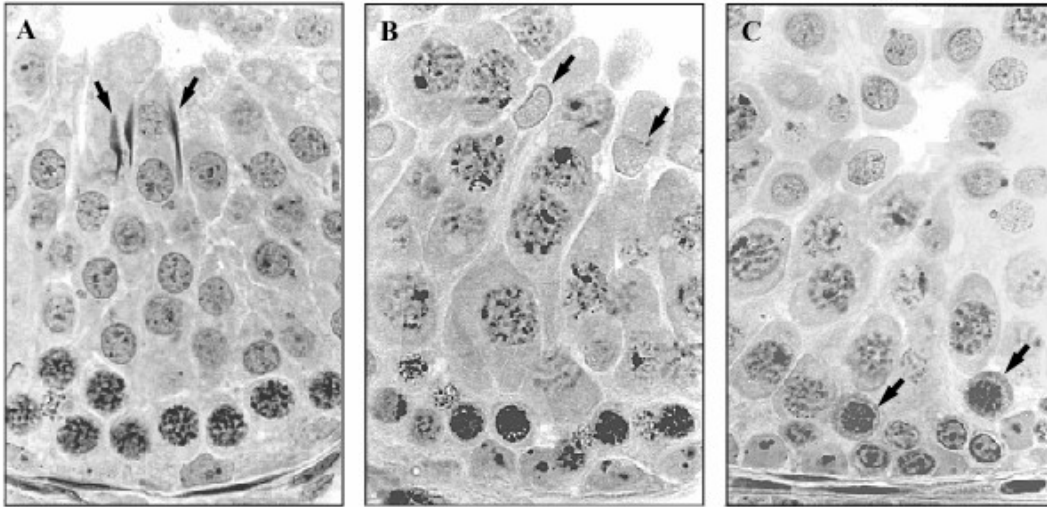


Figura 2. Secções transversais de túbulos seminíferos de ratos Sprague-Dawley com 30 dias de idade. Observe que nos animais controle (A) as células germinativas mais avançadas são espermatídes alongadas na fase 16 (setas) presentes no estágio II-III. Nos animais hiperleptinêmicos (B), as células germinativas mais avançadas são espermatídes alongadas no passo 9 (setas) presentes nos estádios IX-X. Paquítenos em apoptose (setas) são frequentemente observados nos animais hiperleptinêmicos (C). Azul de toluidina, 800x.

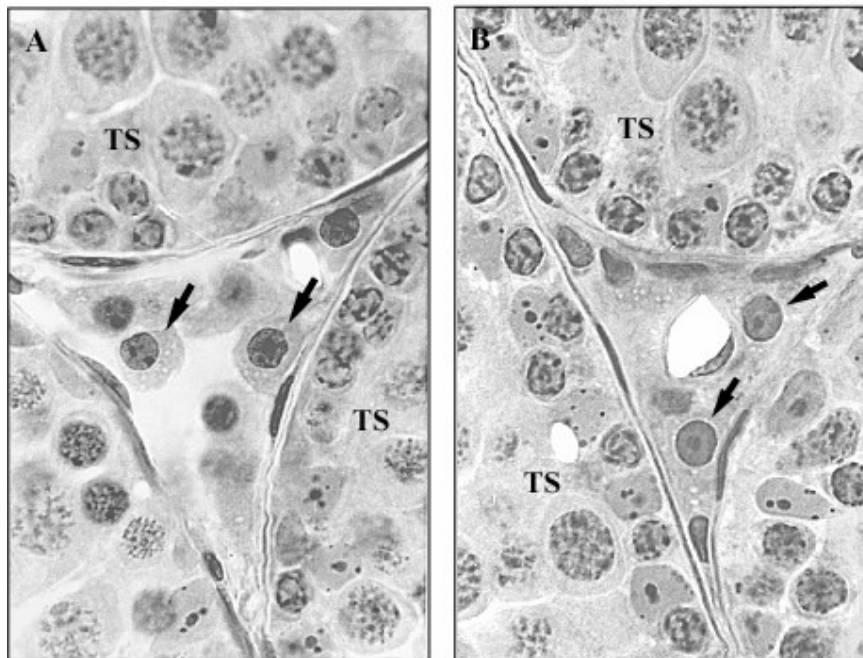


Figura 3. Secções transversais de túbulos seminíferos (TS) e compartimento intertubular em ratos controle (A) e hiperleptinêmicos com 30 dias de idade (B). A morfologia das células de Leydig (setas), em ambos os grupos, é aparentemente similar. Azul de toluidina, 800x.

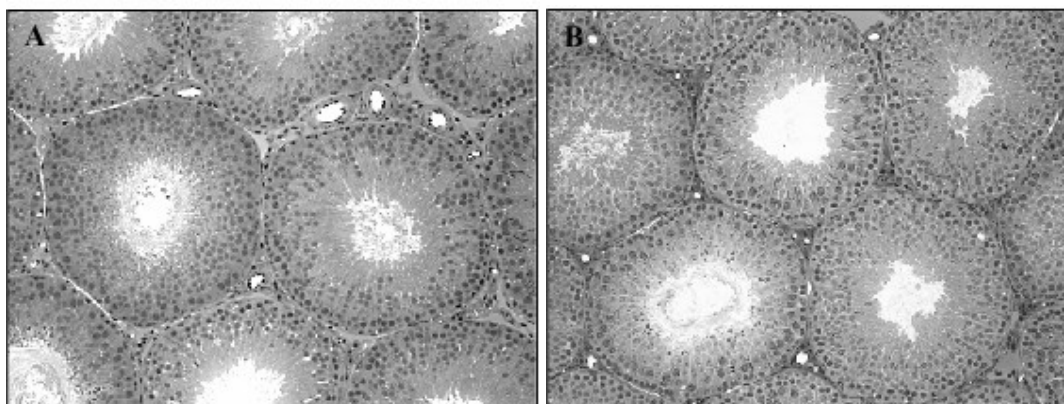


Figura 4. Visão panorâmica da estrutura testicular em ratos adultos controle (A) e hiperleptinêmicos (B). Observe que a estrutura testicular apresenta-se aparentemente normal nos animais tratados. Azul de toluidina, 100x.

Tabela 3. Dados biométricos e morfométricos de ratos controle e tratados com glutamato monossódico (MSG), sacrificados aos 120 dias de idade (n = 9 ratos por grupo; média ± erro padrão).

Parâmetro	Control	MSG
Peso corporal (g)	298 ± 12	267 ± 7*
Depósitos de gordura (g/100g de peso corporal)	2,62 ± 0,24	5,88 ± 0,41*
Peso testicular (mg) ¹	1307 ± 59	1209 ± 61
Peso líquido do testículo (mg) ²	1222 ± 55	1130 ± 57
Índice gonadossomático (%)	0,87 ± 0,02	0,90 ± 0,05
Peso da glândula adrenal (mg) ¹	29,3 ± 1,8	23,9 ± 0,8*
Peso epididimário (mg) ¹	443 ± 32	361 ± 25*
Vesícula seminal + glândula de coagulação (mg) ¹	331 ± 29	205 ± 37*
Comprimento tubular total (m)	15,5 ± 0,8	14,3 ± 0,8
Percentual de túbulos seminíferos (%)	90,0 ± 1,2	92,4 ± 0,5
Volume tubular (mL)	1,09 ± 0,04	1,03 ± 0,05
Percentual de lumen (%)	8,0 ± 1,0	8,0 ± 1,1
Volume de lumen (mL)	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Diâmetro tubular (µm)	299 ± 4	310 ± 7
Eficiência das células de Sertoli	11,1 ± 0,8	12,0 ± 0,5
Célula de Leydig:		
Percentual no testículo (%)	1,4 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Volume no parênquima testicular (µL)	17,0 ± 3	11 ± 2
Diâmetro nuclear (µm)	8,2 ± 0,3	7,7 ± 0,2
Volume individual (µm ³)	1207 ± 107	966 ± 66
Volume citoplasmático (µm ³)	914 ± 84	724 ± 53
Volume nuclear (µm ³)	293 ± 24	242 ± 13
Produção espermática diária por testículo (x10 ⁶)	34,2 ± 1,8	30,0 ± 2,1

* Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05). ¹Somatório dos pesos dos órgãos direito e esquerdo dividido por dois. ²Peso testicular menos peso da túnica albugínea.

Assim como observado para os animais avaliados aos 30 dias de idade, os valores obtidos para depósitos de gordura, níveis plasmáticos de leptina e corticosterona foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos ratos tratados com MSG quando comparados com os animais do grupo controle. Inversamente, as

concentrações plasmáticas de LH e FSH foram menores ($p < 0,05$) nos animais tratados. Por outro lado, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) para as concentrações plasmáticas de prolactina, testosterona e FT₄ (Tabela 4).

Tabela 4. Concentrações hormonais em ratos controle e tratados com glutamato monossódico (MSG), sacrificados aos 120 dias de idade (n = 9 rats por grupo; média \pm erro padrão).

Parâmetro	Controle	MSG
Leptina (ng/mL)	7,26 \pm 1,61	27,04 \pm 5,9*
Prolactina (ng/mL)	7,16 \pm 2,77	5,28 \pm 2,81
FSH (ng/mL)	4,92 \pm 0,40	3,13 \pm 0,28*
LH (ng/mL)	0,38 \pm 0,07	0,19 \pm 0,02*
FT ₄ (ng/dL)	1,20 \pm 0,09	1,11 \pm 0,01
Testosterona (ng/mL)	4,58 \pm 0,58	4,77 \pm 0,78
Corticosterona (μ g/dl)	4,67 \pm 0,95	8,81 \pm 1,24*

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

4.4. Discussão

De acordo com o nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro estudo a investigar a função e a estrutura do trato reprodutivo masculino durante o desenvolvimento de ratos com distúrbios hipotalâmicos devido ao tratamento com MSG no período neonatal. As concentrações plasmáticas de leptina e corticosterona aumentadas e a hiperadiposidade desenvolvida nos ratos tratados com MSG confirmam a eficácia do tratamento com esta neurotoxina (Perello et al., 2003). Além disso, outras alterações hormonais foram características nos animais pré-púberes tratados com MSG, tais como redução nas concentrações de gonadotrofinas, andrógenos e hormônios tireoideanos (Redding et al., 1971; Spinedi et al., 1984). Apesar de ainda controverso (Heiman & Ben-Jonathan, 1983; Bodnar et al., 2001), não encontramos alterações significativas nos níveis plasmáticos de prolactina, hormônio diretamente envolvido no desenvolvimento testicular (Perez-Villamil et al., 1992). Além disso, em ratos tratados com MSG, uma hiperprolactinemia clara foi encontrada em fêmeas, mas não em machos, sugerindo assim um dimorfismo sexual claro do efeito neurotóxico na função dopaminérgica-lactotrófica (Bakke et al., 1978). Nossos

resultados indicam claramente que o tratamento neonatal com MSG induziu a alteração em vários parâmetros do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal examinado aos 30 dias de idade. Entretanto, quando adultos, alguns destes resultados foram normalizados.

Como na maioria das espécies de mamíferos, o desenvolvimento do testículo pós-natal em ratos normais pode ser dividido em duas fases distintas e inversamente relacionadas (Orth, 1993; França et al., 2000). Na primeira fase, que estende-se por 2 a 3 semanas após o nascimento, pode ser observada uma proliferação intensa de células de Sertoli e espermatogônias, promovendo por sua vez o crescimento em comprimento dos cordões seminíferos. Enquanto que, durante a segunda fase, a qual ocorre da segunda a terceira semanas de idade até a sétima ou oitava semanas, é observado aumento notável no número de células germinativas e de células de Leydig adultas (Orth, 1993; França et al., 2000; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001), podendo ser observado também aumento dramático no tamanho do testículo, diâmetro tubular e secreção de fluido pelas células de Sertoli. Essas duas fases são reguladas por hormônios e fatores de crescimento específicos e diferentes (Orth, 1993; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001). Por exemplo, os hormônios FSH e tireoideanos são considerados os

principais reguladores da proliferação e diferenciação das células de Sertoli (Orth, 1993; Sharpe et al., 2003; Cooke et al., 2005), respectivamente. Por outro lado, vários hormônios e fatores de crescimento, tais como hormônios tireoideanos, LH, esteróides, AMH, PDGF-A, TGF- α/β , IGF-1 e citocinas secretadas por macrófagos são responsáveis pela regulação da proliferação e diferenciação das células de Leydig (Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001). Em geral, os fatores relacionados à proliferação e diferenciação das células germinativas são secretados pelas células de Sertoli, principalmente sob influência de andrógenos e FSH (Sharpe, 1994; Griswold, 1998). Da mesma forma, complexa interação entre os compartimentos intertubular e tubular ocorrem durante o desenvolvimento do testículo, permitindo a este órgão executar suas funções endócrina e exócrina (Benahmed et al., 1986; Orth, 1993; Schlatt et al., 1997; França et al., 2000).

Vários dos fatores mencionados acima apresentaram-se significativamente reduzidos nos ratos tratados com MSG e avaliados aos 30 dias de idade e, pelo menos em parte, tais alterações podem explicar os resultados encontrados no presente trabalho, principalmente para a estrutura e função testiculares. Dados não publicados de experimentos sendo desenvolvidos em nossos laboratórios, indicam que ratos tratados com MSG já se encontram hiperleptinêmicos duas semanas após o nascimento. Nesse estágio de desenvolvimento, as concentrações plasmáticas de FSH, LH e hormônios tireoideanos, mas não prolactina, já estão diminuídas nesses animais. Assim, poderíamos esperar menores índices de proliferação de células de Sertoli e células de Leydig, assim como atividade funcional reduzida dessas células. Devemos mencionar que, apesar de não ter sido por nós avaliado, é possível que a conversão de testosterona em estradiol (atividade aromatase adiposa) esteja envolvida no atraso do desenvolvimento das células de Leydig e das suas funções nos ratos tratados com MSG (Vermeulen et al., 2002). Ainda, o maior grau de imaturidade observado para as células de Sertoli e a redução significativa no volume nuclear das células de Leydig e concentrações plasmáticas de testosterona, observada nos animais sacrificados aos 30 dias de idade, confirmariam essa hipótese. Esses resultados provavelmente

refletem na redução do volume de túbulos seminíferos e lume tubular nos ratos tratados com MSG e avaliados na fase pré-puberal. Além disso, considerando que receptores de hormônios tireoideanos estão presentes nas células germinativas e células de Sertoli (Jannini et al., 1995; Buzzard et al., 2000), particularmente a partir de espermatogônia intermediária até paquíteno, os achados relacionados ao aumento do número de células germinativas em apoptose e menor grau de maturidade das células de Sertoli nos ratos tratados na fase pré-puberal podem estar correlacionados com níveis de tiroxina livre mais baixos. Associados aos níveis mais baixos de FT₄, os resultados encontrados para as células de Sertoli com status imaturo sugerem que a atividade proliferativa dessas células foi ligeiramente estendida (Cooke et al., 2005). No entanto, poderíamos esperar menor tamanho testicular e número de células de Sertoli por testículo devido à redução nas concentrações plasmáticas de FSH nos animais tratados com MSG. Corroborando essa hipótese, estudos desenvolvidos em nosso laboratório (Miranda, 2002) mostraram que o hipotireoidismo pós-natal devido ao tratamento com PTU, o qual também diminui os níveis plasmáticos de FSH, associado a administrações diárias de FSH durante as três primeiras semanas após o nascimento, possuem efeito aditivo sobre o número de células de Sertoli por testículo.

Como os receptores de leptina são encontrados em ambos os compartimentos, intertubular e tubular do testículo (El-Hefnawy et al., 2000; Caprio et al., 2003), não podemos excluir um efeito direto da hiperleptinemia no desenvolvimento e nas funções das células de Sertoli, de Leydig e células germinativas. Dihidrotestosterona (DHT), originada pelo metabolismo de T mediado pela 5 α -reductase, é importante para a função epididimária (Robaire & Viger, 1995; Ezer e Robaire, 2002). Assim, o peso epididimário significativamente reduzido observado nos animais tratados com MSG pode estar correlacionado com os níveis de testosterona mais baixos encontrados nestes animais. A diminuição observada para peso da glândula adrenal está de acordo com dados publicados anteriormente (Dolnikoff et al., 1988), sugerindo que as mudanças no tamanho/morfologia do córtex adrenal são sintomáticas do estímulo trófico. Como esperado, os níveis plasmáticos de FSH e LH

apresentaram-se alterados nos ratos tratados com MSG avaliados na idade adulta, indicando lesão permanente no núcleo arqueado destes animais (Clemens et al., 1978). Nossos dados, de acordo com observações anteriores, indicam que os níveis plasmáticos de testosterona (Giovambattista et al., 2003) e de hormônios tireoideanos (Miskowiak & Partyka, 1993) foram similares nos ratos tratados com MSG e controles avaliados aos 120 dias de idade.

É válido mencionar que os dados obtidos no presente estudo para os parâmetros funcionais e estruturais de ratos adultos do grupo controle, inclusive sobre as células de Leydig, estão dentro da gama de dados apresentados para ratos na literatura (Russel & França, 1995; Mori & Christensen, 1980; Zirkin & Ewing, 1987). Exceto pelo número de células de Sertoli por testículo, os valores obtidos para os parâmetros relacionados aos túbulos seminíferos foram similares em ratos adultos tratados com MSG e controles. Estes dados indicam que alterações devido ao tratamento com MSG e hiperleptinemia, relacionadas à função das células de Sertoli e ao processo espermatogênico, podem ser revertidas na idade adulta. Todavia, como geralmente a atividade proliferativa das células de Sertoli não se estende além das 2-3 semanas após o nascimento (Orth, 1993; Sharpe et al., 2003), o número final de tais células por testículo permaneceu baixo após 30 dias de idade nos ratos tratados com MSG.

Como cada célula de Sertoli pode suportar um número limitado e aproximadamente fixo de células germinativas para cada espécie, já é de conhecimento geral na literatura que o número de células de Sertoli, estabelecido durante o período pré-puberal, determina o tamanho final do testículo e a magnitude da produção espermática em animais sexualmente maduros (Berndtson et al., 1987; Orth et al., 1988; Johnson et al., 1994; França & Russell, 1998). A esse respeito, baseado no número de células de Sertoli por testículo, poderíamos esperar uma baixa produção espermática diária por testículo (eficiência espermatogênica) em ratos tratados com MSG adultos. Entretanto, experimentos nos quais o número de células de Sertoli por testículo apresentou-se aumentado ou diminuído observaram, respectivamente, redução (Hesse et al., 1993; Vermeulen et al., 2002) ou elevação (dados não publicados a partir de nosso

laboratório) do número de células germinativas para cada célula de Sertoli. Na verdade, apesar de não ter sido significativamente diferente, quando comparada à eficiência das células de Sertoli no grupo controle, os resultados observados no grupo tratado com MSG apresentaram-se aproximadamente dez por cento mais altos. Tal resultado provavelmente explica a razão de os valores encontrados para a eficiência espermatogênica terem sido parecidos em ambos os grupos avaliados. Paradoxalmente, diferentemente do observado no presente trabalho, diante do menor número de células de Sertoli por testículo deveríamos esperar níveis mais altos de FSH (Dohle et al., 2003). Apesar de não ser totalmente compreendido, os distúrbios promovidos no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal devido ao tratamento com MSG provavelmente mascaram o significado real dos níveis plasmáticos reduzidos de FSH observados no presente modelo. Também não podemos deixar de ressaltar que a avaliação dos níveis de inibina B nos animais tratados com MSG poderia fornecer informações adicionais a respeito da função das células de Sertoli.

Apesar dos vários parâmetros relacionados à função das células de Leydig, tais como volume individual e volume total ocupado por tal célula no compartimento intertubular, terem mostrado clara tendência para diminuição nos animais adultos hiperleptinêmicos, os níveis plasmáticos de testosterona permaneceram normais. Os menores pesos dos órgãos sexuais acessórios observados nos ratos adultos hiperleptinêmicos, assim como os níveis plasmáticos normais de T, provavelmente resultaram da atividade esteroidogênica reduzida das células de Leydig, durante o período crítico do desenvolvimento testicular. Além disso, como esses órgãos são andrógeno-dependentes (Robaire & Viger, 1995; Ezer & Robaire, 2002; Perello et al., 2004), alterações na conversão de testosterona em diidrotestosterona não podem ser descartadas, assim como um efeito direto da leptina nos testículos dos ratos tratados com MSG. Estudos recentes mostraram que ratos tratados com MSG apresentaram disfunção das células de Leydig *in vitro* ao serem expostas a diferentes concentrações de hCG (Giovambattista et al., 2003). Também foi sugerido neste estudo que, em testículos de ratos normais, a leptina pode representar um fator inibitório adicional à esteroidogênese testicular (P450ssc, StAR e 17

β -HSD). Além disso, a hiperleptinemia crônica induzida pelos efeitos neurotóxicos poderia ser responsável pela inibição da expressão de mRNA para receptores de leptina no testículo de ratos adultos (Giovambattista et al., 2003). Entretanto, como animais tratados com MSG desenvolvem precocemente hiperadiposidade/hiperleptinemia, provavelmente como consequência da maior atividade corticoadrenal (Perello et al., 2004), ainda precisa ser determinado se a própria lesão hipotalâmica ou sua associação com alterações na relação tecido adiposo/adrenal são fatores determinantes para as alterações na fertilidade de ratos machos tratados com MSG (Pizzi et al., 1977). De fato, deveria ser considerado que a hiperatividade corticoadrenal poderia estar diretamente envolvida na atividade reduzida do eixo hipotalâmico (LHRH)-gonadotrófico (LH) (Lalau et al., 1990), resultando assim em alterações na maturação sexual (Biagini & Pich, 2002) em ratos tratados com MSG. Ainda precisa ser determinado se a correção da hipercorticosteronemia, observada nos animais com fenótipo hiperadiposo (Pizzi et al., 1977), em ratos tratados com MSG poderia evitar uma função reprodutiva masculina debilitada. Para melhor compreensão dos mecanismos relacionados às nossas descobertas sobre as alterações na reprodução caracterizadas em animais tratados com MSG, estudos em ratos hiperleptinêmicos crônicos, devido à administração de leptina exógena diária durante o desenvolvimento, estão em desenvolvimento.

Para concluir, nossos resultados indicam que animais tratados com MSG apresentam características de alterações do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal: 1) alteração na proliferação de células de Sertoli e de Leydig ao longo do desenvolvimento; 2) diminuição no número de células de Sertoli por testículo, único elemento tubular comprometido já anteriormente à puberdade; e 3) pesos reduzidos dos órgãos sexuais acessórios, em ambas as idades investigadas, os quais provavelmente resultaram da atividade esteroidogênica reduzida de células de Leydig durante o período crítico do desenvolvimento testicular. Ainda precisa ser avaliado se a hiperleptinemia a longo prazo é o principal fator para as alterações no desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal nos ratos tratados com MSG.

4.5. Referências bibliográficas

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anatomical Record*, v.94, p.238-248, 1946.
- AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls: III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *American Journal of Anatomy*, v.110, p.49-67, 1962.
- BAKKE, J.L.; LAWRENCE, N.; BENNETT, J. et al. Late endocrine effects of administering monosodium glutamate to neonatal rats. *Neuroendocrinology*, v.26, n.4, p.220-228, 1978.
- BANKS, W.A.; MCLAY, R.N.; KASTIN, A.J. et al. Passage of leptin across the blood-testis barrier. *American Journal of Physiology*, v.276, n.6 Pt 1, p.E1099-1104, 1999.
- BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S. et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, v.137, n.7, p.3144-3147, 1996.
- BENAHMED, M.; TABONE, E.; GRENOT, C. et al. Paracrine control of Leydig cell activity by FSH dependent proteins from Sertoli cells: an in vitro study. *Journal of Steroid Biochemistry*, v.24, n.1, p.311-315, 1986.
- BERNDTSON, W.E.; IGBOELI, G.; PICKETT, B.W. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *Journal of Animal Science*, v.64, n.1, p.241-246, 1987.
- BIAGINI, G.; PICH, E.M. Corticosterone administration to rat pups, but not maternal separation, affects sexual maturation and glucocorticoid receptor immunoreactivity in the testis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.73, n.1, p.95-103, 2002.
- BJORBAEK, C.; KAHN, B.B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Progress in Hormone Research*, v.59, p.305-331, 2004.
- BODNAR, I.; GOOZ, P.; OKAMURA, H. et al. Effect of neonatal treatment with monosodium

- glutamate on dopaminergic and L-DOPA-ergic neurons of the medial basal hypothalamus and on prolactin and MSH secretion of rats. *Brain Research Bulletin*, v.55, n.6, p.767-774, 2001.
- BUZZARD, J.J.; MORRISON, J.R.; O'BRYAN, M.K. et al. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of Reproduction*, v.62, n.3, p.664-669, 2000.
- CAPRIO, M.; FABBRINI, E.; ISIDORI, A.M. et al. Leptin in reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v.12, n.2, p.65-72, 2001.
- CAPRIO, M.; FABBRINI, E.; RICCI, G. et al. Ontogenesis of leptin receptor in rat Leydig cells. *Biology of Reproduction*, v.68, n.4, p.1199-1207, 2003.
- CAPRIO, M.; ISIDORI, A.M.; CARTA, A.R. et al. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology*, v.140, n.11, p.4939-4947, 1999.
- CLEMENS, J.A.; ROUSH, M.E.; FULLER, R.W. et al. Changes in luteinizing hormone and prolactin control mechanisms produced by glutamate lesions of the arcuate nucleus. *Endocrinology*, v.103, n.4, p.1304-1312, 1978.
- COOKE, P.S.; HOLSBERGER, D.R.; FRANÇA, L.R. Thyroid hormone regulation of Sertoli cell development. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. (Ed.). *Sertoli cell biology*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2005. p.217-226.
- DOHLE, G.R.; SMIT, M.; WEBER, R.F. Androgens and male fertility. *World Journal of Urology*, v.21, n.5, p.341-345, 2003.
- DOLNIKOFF, M.S.; KATER, C.E.; EGAMI, M. et al. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rat. *Neuroendocrinology*, v.48, n.6, p.645-649, 1988.
- EL-HEFNAWY, T.; IOFFE, S.; DYM, M. Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. *Endocrinology*, v.141, n.7, p.2624-2630, 2000.
- EZER, N.; ROBAIRE, B. Androgenic regulation of the structure and functions of the epididymis. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. (Ed.). *The epididymis: from molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2002. p.297-316.
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. *Tese (Doutorado)*, Belo Horizonte, UFMG – Instituto de Ciências Biológicas, 1991. 185p.
- FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION (ICAR), 12, 1992, Netherlands, *Resumos*. Netherlands: The Hague, 1992. p.1716-1718.
- FRANÇA, L.R.; GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, v.68, n.5, p.1554-1561, 2003.
- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTÍNEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J., (Ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. España: Churchill Communications Europe España, 1998. p.197-219.
- FRANÇA, L.R.; SILVA JR., V.A.; CHIARINI-GARCIA, H. et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, v.63, n.6, p.1629-1636, 2000.
- GARCIA-MAYOR, R.V.; ANDRADE, M.A.; RIOS, M. et al. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.82, n.9, p.2849-2855, 1997.
- GIOVAMBATTISTA, A.; CHISARI, A.N.; GAILLARD, R.C. et al. Food intake-induced leptin secretion modulates hypothalamo-pituitary-adrenal axis response and hypothalamic Ob-Rb expression to insulin administration. *Neuroendocrinology*, v.72, n.6, p.341-349, 2000.

- GIOVAMBATTISTA, A.; SUESCUN, M.O.; NESSRALLA, C.C. et al. Modulatory effects of leptin on leydig cell function of normal and hyperleptinemic rats. *Neuroendocrinology*, v.78, n.5, p.270-279, 2003.
- GRISWOLD, M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v.9, n.4, p.411-416, 1998.
- HEIMAN, M.L.; BEN-JONATHAN, N. Increase in pituitary dopaminergic receptors after monosodium glutamate treatment. *American Journal of Physiology*, v.245, n.3, p.E261-265, 1983.
- HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D. et al. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology*, v.132, n.6, p.2607-2613, 1993.
- HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, n.2, p.209-213, 1978.
- JANNINI, E.A.; ULISSE, S.; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocrine Reviews*, v.16, n.4, p.443-459, 1995.
- JOHNSON, L.; CARTER, G.K.; VARNER, D.D. et al. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.100, n.1, p.315-321, 1994.
- LAHLOU, N.; CLEMENT, K.; CAREL, J.C. et al. Soluble leptin receptor in serum of subjects with complete resistance to leptin: relation to fat mass. *Diabetes*, v.49, n.8, p.1347-1352, 2000.
- LALAU, J.D.; AUBERT, M.L.; CARMIGNAC, D.F. et al. Reduction in testicular function in rats. II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. *Neuroendocrinology*, v.51, n.3, p.289-293, 1990.
- MAGNI, P.; MOTTA, M.; MARTINI, L. Leptin: a possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regulatory Peptides*, v.92, n.1-3, p.51-56, 2000.
- MCGREGOR, G.P.; DESAGA, J.F.; EHLENZ, K. et al. Radiomunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetic human subjects. *Endocrinology*, v.137, n.4, p.1501-1504, 1996.
- MENDIS-HANDAGAMA, S.M.; ARIYARATNE, H.B. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of Reproduction*, v.65, n.3, p.660-671, 2001.
- MIRANDA, J.R. Efeitos do tratamento neonatal com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) e FSH na proliferação das células de Sertoli e função testicular em ratos Wistar adultos. *Dissertação (Mestrado)*, Belo Horizonte, UFMG - Escola de Veterinária, 2002. 47p.
- MISKOWIAK, B.; PARTYKA, M. Effects of neonatal treatment with MSG (monosodium glutamate) on hypothalamo-pituitary-thyroid axis in adult male rats. *Histology and Histopathology*, v.8, n.4, p.731-734, 1993.
- MORI, H.; CHRISTENSEN, A.K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *Journal of Cell Biology*, v.84, n.2, p.340-354, 1980.
- MOUNZIH, K.; LU, R.; CHEHAB, F.F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology*, v.138, n.3, p.1190-1193, 1997.
- ORTH, J.M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: DESJARDINS, C.; EWING, L.L., (Ed.). *Cell and molecular biology of the testis*. New York, CL: Oxford University Press, 1993. p.3-42.
- ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v.122, n.3, p.787-794, 1988.
- PERELLO, M.; GAILLARD, R.C.; CHISARI, A. et al. Adrenal enucleation in MSG-damaged hyperleptinemic male rats transiently restores

- adrenal sensitivity to leptin. *Neuroendocrinology*, v.78, n.3, p.176-184, 2003.
- PERELLO, M.; MORENO, G.; GAILLARD, R.C. et al. Glucocorticoid-dependency of increased adiposity in a model of hypothalamic obesity. *Neuro Endocrinol Lett*, v.25, n.1-2, p.119-126, 2004.
- PEREZ-VILLAMIL, B.; BORDIU, E.; PUENTE-CUEVA, M. Involvement of physiological prolactin levels in growth and prolactin receptor content of prostate glands and testes in developing male rats. *Journal of Endocrinology*, v.132, n.3, p.449-459, 1992.
- PIZZI, W.J.; BARNHART, J.E.; FANSLOW, D.J. Monosodium glutamate administration to the newborn reduces reproductive ability in female and male mice. *Science*, v.196, n.4288, p.452-454, 1977.
- REDDING, T.W.; SCHALLY, A.V.; ARIMURA, A. et al. Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinology*, v.8, n.3, p.245-255, 1971.
- ROBAIRE, B.; VIGER, R.S. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction*, v.52, n.2, p.226-236, 1995.
- RUSH, M.E. Follicle-stimulating hormone secretion in monosodium glutamate-lesioned rats: response to unilateral gonadectomy or porcine follicular fluid (inhibin). *Life Science*, v.38, n.21, p.1941-1949, 1986.
- RUSSELL, L.D.; CORBIN, T.J.; BORG, K.E. 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*, v.133, n.5, p.2062-2070, 1993.
- RUSSELL, L.D.; DE FRANCA, L.R. Building a testis. *Tissue and Cell*, v.27, n.2, p.129-147, 1995.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P. et al. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. 1. Clearwater, Fla.: Cache River Press, 1990. 286p.
- SCHLATT, S.; MEINHARDT, A.; NIESCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal Endocrinology*, v.137, n.2, p.107-117, 1997.
- SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D., (Ed.). *The physiology of reproduction*. 2. New York: Raven Press, 1994. v.1, p.1363-1434.
- SHARPE, R.M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, v.125, n.6, p.769-784, 2003.
- SMITH, G.D.; JACKSON, L.M.; FOSTER, D.L. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.73-86, 2002.
- SONE, M.; NAGATA, H.; TAKEKOSHI, S. et al. Expression and localization of leptin receptor in the normal rat pituitary gland. *Cell and Tissue Research*, v.305, n.3, p.351-356, 2001.
- SPINEDI, E.; JOHNSTON, C.; NEGRO-VILAR, A. Increased responsiveness of the hypothalamic-pituitary axis after neurotoxin-induced hypothalamic denervation. *Endocrinology*, v.115, n.1, p.267-272, 1984.
- SUESCUN, M.O.; CALANDRA, R.S.; LUSTIG, L. Alterations of testicular function after induced autoimmune orchitis in rats. *Journal of Andrology*, v.15, n.5, p.442-448, 1994.
- SUESCUN, M.O.; GONZALEZ, S.I.; CHIAUZZI, V.A. et al. Effects of induced hypoprolactinemia on testicular function during gonadal maturation in the rat. *Journal of Andrology*, v.6, n.2, p.77-82, 1985.
- TARTAGLIA, L.A.; DEMBSKI, M.; WENG, X. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, v.83, n.7, p.1263-1271, 1995.

TENA-SEMPERE, M.; PINILLA, L.; ZHANG, F.P. et al. Developmental and hormonal regulation of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Biology of Reproduction*, v.64, n.2, p.634-643, 2001.

VERMEULEN, A.; KAUFMAN, J.M.; GOEMAERE, S. et al. Estradiol in elderly men. *Aging Male*, v.5, n.2, p.98-102, 2002.

ZAR, J. *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1974.

ZIRKIN, B.R.; EWING, L.L. Leydig cell differentiation during maturation of the rat testis: a stereological study of cell number and ultrastructure. *Anatomical Record*, v.219, n.2, p.157-163, 1987.