

**PAPEL DA SINALIZAÇÃO TGF- β NO NICHOS
ESPERMATOGONIAL DE ZEBRAFISH**

DANIEL FERNANDES DA COSTA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

PAPEL DA SINALIZAÇÃO TGF- β NO NICHOS
ESPERMATOGONIAL DE ZEBRAFISH

DANIEL FERNANDES DA COSTA

ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Genética

**BOTUCATU-SP
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Costa, Daniel Fernandes da.

Papel da sinalização TGF- β ; no nicho espermatogonial de Zebrafish / Daniel Fernandes da Costa. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rafael Henrique Nóbrega

Capes: 20204000

1. Fatores de crescimento transformadores. 2. Proteína Nodal. 3. Espermatogênese. 4. Inibidores químicos. 5. Peixe-zebra.

Palavras-chave: A83-01; Nodal; TGF- β ; espermatogênese; zebrafish.

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, para os devidos fins e de acordo com os assentamentos existentes na Seção Técnica de Pós-graduação, que DANIEL FERNANDES DA COSTA, RG nº 48.805.393-6, expedido pela SSP/SP, cumpriu todas as atividades do Programa de Pós-graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA), deste INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU, curso de Mestrado Acadêmico.

Certificamos, também, que o interessado defendeu, no dia 20/12/2018, a dissertação de mestrado intitulada 'PAPEL DA SINALIZAÇÃO TGF- NO NICHOS ESPERMATOGONIAL DE ZEBRAFISH', tendo sido APROVADO diante de Comissão Examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NÓBREGA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Pós-Doc LUIZ HENRIQUE DE CASTRO ASSIS (Participação Presencial) do(a) Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências - Unesp, Profa. Dra. GISELE CRISTIANE DE MELO DIAS do(a) Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo (Por meio de Videoconferência).

Certificamos, ainda, que o Programa de Pós-graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA), deste INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU, curso de Mestrado Acadêmico, foi reconhecido pelo MEC, conforme Portaria nº 656/2017, de 22/05/2017. Certificamos, finalmente, que o título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética) obtido pelo interessado foi homologado pelo(a) Congregação, deste INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU em 06/02/2019, conforme o Regimento Geral de Pós-graduação.

Documento emitido às 00:10 do dia 15/08/2024
Código de autenticidade: 8713-94E1-93BB-C171-C273-D478-5DE8-C9B7
Documento válido até às 00:10 do dia 14/10/2024



Dedicatória

Aos meus pais, Antonio Maria Fernandes da Costa e Mirian Aparecida da Silva Fernandes da Costa (in memoriam) pelo apoio, incentivo e acima de tudo, a educação que recebi; são meus maiores exemplos;

Aos meus irmãos, Mateus, Alexandre, Júlio Henrique e Sara;

Aos peixes utilizados para a construção desse trabalho;

Aos grandes escritores e músicos que me inspiram;

Aos educadores;

Aos que cansaram das convenções sociais e não reservam qualquer minuto para mesquinhas;

Aos genuinamente desgraçados;

Aos que morreram sem encontrar qualquer sentido em suas vidas;

Essa singela homenagem;

Dedico.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Paulista “Júlio de Mesquita Filho (UNESP), ao Instituto de Biociências, ao Departamento de Morfologia da Unesp, campus de Botucatu e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Genética, pela oportunidade de cursar o mestrado nesta Instituição;

Ao prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega (Orientador), por me receber em seu grupo de pesquisa, disponibilizando seu tempo e atenção, além da confiança depositada e conhecimentos compartilhados, sem os quais, a realização deste projeto não seria possível;

A Agência de fomento, Capes;

Aos colegas de laboratório, Reproductive and Molecular Biology Group, pelo companheirismo e os ensinamentos práticos e teóricos que me fizeram crescer como pessoal e profissional, contribuindo para a formação do meu caráter científico;

Aos colegas, Marcos e Camila, pelo auxílio nas etapas finais do projeto, possibilitando que a dissertação fosse defendida na data estabelecida;

Ao amigo Arno, com quem sempre pude contar;

Aos amigos Jorge Ribeiro e Jorge Luís, por dividirem boas músicas e ideias;

Ao amigo de longa data, Victor, companheiro de desgraça, álcool e infortúnios.

O existencialismo não é um deleite lamentável, mas uma filosofia humanista de ação, esforço, combate e solidariedade. O homem deve criar sua própria essência: é ao se jogar no mundo, sofrendo ali, lutando ali, que gradualmente define o que esse homem é antes de morrer, ou o que a humanidade é antes de desaparecer . (Jean-Paul Sartre)

Você tem que morrer algumas vezes antes de realmente viver (Charles Bukowski)

Nunca é alto o preço a pagar pelo privilégio de pertencer a si mesmo (Friedrich Nietzsche)

Não sou nada. Nunca serei nada. Não posso querer ser nada. À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo. (Álvaro de Campos ; Fernando Pessoa)

*Pra fazer um samba com beleza é preciso
um bocado de tristeza*

(Vinícius de Moraes)

Resumo

A via de sinalização TGF- β está presente em todos os metazoários, regulando diversas etapas do desenvolvimento embrionário e da resposta imunológica, além de estar envolvida no processo carcinogênico e regulação da espermatogênese. A espermatogênese é um processo altamente organizado, cujo funcionamento adequado garante a sobrevivência das espécies. Maiores estudos que auxiliem na compreensão dos mecanismos endócrinos e parácrinos responsáveis pelo refinamento dos processos que ocorrem no nicho espermatogonial são necessários. Visto isso, a via de TGF- β por mediar processos celulares fundamentais para a função testicular (auto-renovação e diferenciação), se torna de grande relevância para uma compreensão mais ampla do processo espermatogênico. Uma abordagem muito valiosa para o entendimento da função testicular é a utilização de inibidores específicos de vias de sinalização. Dito isso, com o intuito de avaliar o papel da subfamília TGF- β no nicho espermatogonial de zebrafish, foi utilizado o inibidor A83-01, bloqueador da ativação da subfamília TGF- β (TGF- β , Inibina, Actina e Nodal). Também, foi avaliado o papel do Fsh na via de sinalização TGF- β , de forma a agregar aspectos importantes sobre essa sinalização e sua influência no nicho espermatogonial de teleósteos. Nossos resultados mostram que o inibidor potencializou os efeitos de pró-diferenciação do Fsh, favorecendo diferenciação excessiva e reduzindo os estoques de espermatogônias tronco. Desta forma, conclui-se que os resultados aqui encontrados indicam que a subfamília TGF- β atua como fator pró-proliferação, promovendo auto-renovação espermatogonial.

Abstract

The TGF- β signaling pathway is ubiquitous among the metazoans, regulating several stages of both embryonic development and immunological responses, being also involved in the carcinogenic process and spermatogenesis regulation. Spermatogenesis is a highly organized process, in which adequate functioning guarantees the survival of the species. Further studies concerning endocrine and paracrine mechanisms are necessary. Based on that, due to the fact that the TGF- β mediates cellular processes that are fundamental to the testis function (self-renewal and differentiation), it becomes relevant for a better comprehension of the spermatogenetic process. In this context, a valuable approach to understand the testis function is the use of specific signaling pathway inhibitors. Therefore, this work aimed to evaluate the role of TGF- β subfamily in the zebrafish spermatogonial niche, using A83-01, as a selective inhibitor of TGF- β subfamily (TGF- β , inhibin, activin and nodal). The role of Fsh in the Tgf- β signaling pathway was also evaluated, aggregating important aspects about this signaling in the teleost spermatogonial niche. Our results showed that A83-01 potentialized the pro-differentiation effects of Fsh, promoting an excessive spermatogonial differentiation and depletion of spermatogonial stem cells. In conclusion, the results found here indicate that TGF- β subfamily acts as a pro-proliferation factor, promoting spermatogonial stem cell self-renewal and/or inhibiting spermatogonial differentiation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1 - O NICO ESPERMATOGONIAL	8
1.2 A VIA DE SINALIZAÇÃO TGF- β	12
1.3 MECANISMOS REGULATÓRIOS DA ESPERMATOGÊNESE	16
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
ANIMAIS	23
CULTURA DE TESTÍCULOS	23
EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL (QPCR) E ANÁLISE MORFOLÓGICA	24
ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5. RESULTADOS	26
EFEITOS DO INIBIDOR A83-01 NA EXPRESSÃO GÊNICA DE EXPLANTES TESTICULARES CULTIVADOS EM CONDIÇÕES BASAIS	26
EFEITOS DO INIBIDOR A83-01 NA EXPRESSÃO GÊNICA DE EXPLANTES TESTICULARES ESTIMULADOS COM RZF FSH	29
EFEITOS DO INIBIDOR A83-01 NA MORFOLOGIA E FREQUÊNCIA ESPERMATOGONIAL DE EXPLANTES TESTICULARES ESTIMULADOS COM RZF FSH	32
EFEITOS DO FSH NA EXPRESSÃO DAS DIFERENTES SMADS DE EXPLANTES TESTICULARES	34
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	41

1. Introdução Geral

1.1 - O nicho espermatogonial

A espermatogênese é um processo altamente organizado e complexo, no qual células indiferenciadas - as espermatogônias tronco - são responsáveis por transmitir o material genético de um indivíduo para a próxima geração, após sucessivos ciclos de mitose e meiose (Hess & Franca, 2008; Schulz *et al.*, 2010). As espermatogônias tronco são, portanto, as únicas células tronco do organismo capazes de contribuir na formação do material genético da prole.

Assim como todas as células tronco, as espermatogônias tronco possuem propriedades de se auto-renovarem para manter seu número nos testículos, como também de produzir células diferenciadas comprometidas com o processo espermatogênico (De Rooij & Russel, 2000; Nóbrega *et al.*, 2009). O balanço adequado entre estes dois processos é essencial para assegurar a homeostase e a continuidade da espermatogênese (Nóbrega *et al.*, 2014). Por exemplo, caso a auto-renovação seja predominante, a espermatogênese será interrompida, formando um tumor testicular (De Rooij *et al.*, 2006a, b). Por outro lado, se a diferenciação é favorecida, o tecido gradativamente perde sua função devido à ausência de novas espermatogônias tronco (De Rooij *et al.*, 2006 a, b).

As espermatogônias tronco residem em um microambiente específico no testículo denominado de nicho espermatogonial (Oatley & Brinster, 2008; De Rooij, 2009). Tanto em peixes como em mamíferos, o nicho é composto por dois tipos celulares, as células germinativas e as células somáticas. A linhagem germinativa é formada pelas espermatogônias tronco. Em peixes, estudos têm descrito dois tipos de espermatogônias tronco: tipo A indiferenciada quiescente (A_{und*}) e tipo A indiferenciada ativa (A_{und}) até o presente momento, não é sabido se estas células estão separadas por divisão mitótica ou se

constituem o mesmo tipo celular em diferentes etapas do ciclo celular (Nóbrega *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2010; Camargo *et al.*, 2017).

As células somáticas dão suporte estrutural e também criam um cenário molecular propício para a sobrevivência, manutenção e atividade das espermatogônias tronco. As células somáticas que constituem o nicho são: as células de Sertoli, as peritubulares mióides e as células de Leydig (Nóbrega *et al.*, 2010). As células de Sertoli estão localizadas no interior dos túbulos seminíferos em íntimo contato com as espermatogônias tronco. Em amniotas (répteis e mamíferos), as espermatogônias tronco estão localizadas no compartimento basal, apoiadas sobre uma membrana basal, e circundadas adjacientemente por células de Sertoli (**Figura 1A**) (McLean 2005; De Rooij, 2006b). Já em anamniotas (peixes e anfíbios), as células de Sertoli circundam completamente uma espermatogônias tronco, formando uma estrutura, conhecida como espermatocisto ou cisto (**Figura 1B**) (Grier, 1993; Schulz *et al.*, 2010). Nestes vertebrados, as espermatogônias tronco não estão apoiadas sobre a membrana basal (Nóbrega *et al.*, 2010).

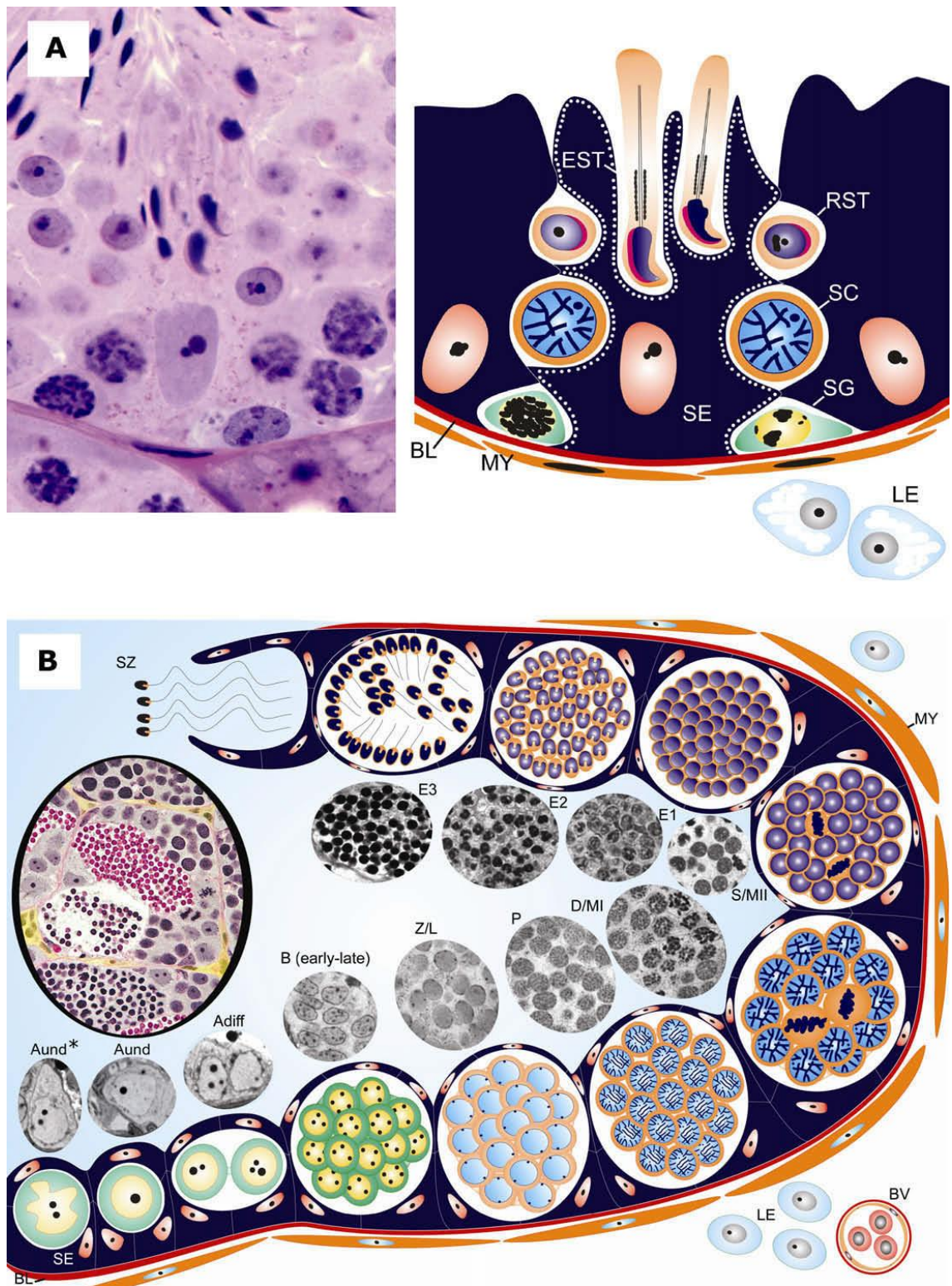


Figura 1: Comparação entre a espermatogênese em estádios de amniotas (répteis, aves, mamíferos) (A) e espermatogênese cística dos anamniotas (peixes, anfíbios) (B). A Figura ilustra as diferenças entre a relação célula de Sertoli/célula germinativa na espermatogênese em estádios e cística. Em A, a célula de Sertoli suporta ao mesmo tempo diferentes “clones” de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento. Enquanto que em B, a célula de Sertoli suporta apenas um “clone” em uma

mesma fase de desenvolvimento por vez. Células de Sertoli (SE); lâmina basal (BL); células peritubulares mióides (MY), células de Leydig (LE), espermatogônia (SG); espermátócito (SC); espermátide arredondada (RST); espermátide alongada (EST); espermatogônia do tipo A indiferenciada* (Aund*) (célula tronco?); espermatogônia do tipo A indiferenciada (Aund); espermatogônia do tipo A diferenciada (Adiff); espermatogônia do tipo B (B early-late); espermátócitos primários em leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno/metáfase I (D/MI); espermátócitos secundários/metáfase II (S/MII); espermátides iniciais (E1); intermediárias (E2); finais (E3); espermatozóides (SZ); e vasos sanguíneo (BV). Retirado de Schulz et al., 2010.

Além do suporte estrutural, as células de Sertoli também são responsáveis por integrar sinais endócrinos, traduzindo-os em fatores de crescimento (Nóbrega *et al.*, 2014; Lacerda *et al.*, 2012). As células peritubulares mióides envolvem os túbulos seminíferos e providenciam suporte estrutural a estes. Estas células também secretam fatores de crescimento e componentes de matriz extracelular, indicando importante papel destas células na regulação das espermatogônias tronco (Skinner *et al.*, 1985; Spinnler *et al.*, 2010). As células de Leydig, encontradas no compartimento intersticial, tem como função produzir andrógenos, fatores de crescimento (Oatley *et al.*, 2009) e peptídeos da família relaxina como o Insl3 (Assis *et al.*, 2016). As espermatogônias indiferenciadas estão preferencialmente distribuídas em regiões do túbulo seminífero adjacentes ao compartimento intersticial, onde se localizam as células de Leydig (Chiarini-Garcia *et al.*, 2001., 2003; Lacerda *et al.*, 2014) (**Figura 2**). Esta localização, provavelmente ocorre em função do maior aporte de fatores essenciais para a regulação das espermatogônias tronco, incluindo oxigênio, gonadotropinas hipofisárias como o hormônio Folículo-estimulante (Fsh) e hormônio Luteinizante (Lh), que atuam na célula de Sertoli e Leydig.

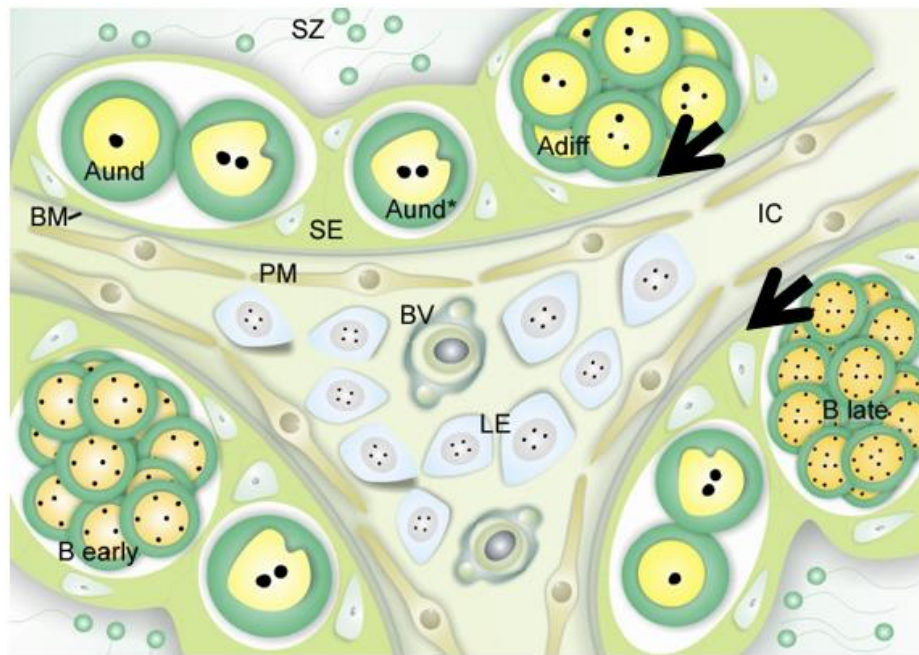


Figura 2. Nicho espermatogonial em zebrafish, *Danio rerio*. As espermatogônias tronco distribuem-se preferencialmente nas regiões dos túbulos seminíferos próximas das áreas de confluência de tecido intersticial, onde estão localizadas as células produtoras de esteróides, as células de Leydig (LE), vasos sanguíneos (BV) e outros elementos do tecido conjuntivo. BM, membrana basal; PM, células peritubulares mióides; SE, células de Sertoli; A_{und}^*/A_{und} , espermatogônias iniciais; Adiff, espermatogônias diferenciadas; B early, espermatogônias do tipo B inicial; B Late, espermatogônias do tipo B final; SZ, espermatozoides; e seta indicando o epitélio germinativo. Retirado de Nóbrega (2014).

1.2 A Via de sinalização TGF- β

A via de sinalização TGF- β é uma via de regulação gênica altamente complexa e conservada nos organismos multicelulares. Esta via foi delineada por volta dos anos 90 e desde então vem sendo amplamente estudada em diversos modelos biológicos (Massagué *et al.*, 2000; Massagué & Xi, 2012). A sinalização TGF- β está relacionada à papéis chave no controle do desenvolvimento ontogenético, regulando processos como formação da mesoderme, endoderme e especificações de simetria. Ademais, controla mecanismos celulares pós-ontogênese, como auto-renovação, diferenciação e apoptose, além de estar envolvida no

processo carcinogênico e na resposta imunológica (Kitisin *et al.*, 2007; Laux *et al.*, 2011; Massagué & Xi., 2012).

A via de sinalização TGF- β tem sua ativação iniciada pelos membros da superfamília TGF- β (*transforming growth factor- β*), composta por mais de 40 ligantes proteicos de regulação autócrina e parácrina. Algumas dessas proteínas são conhecidas por múltiplos nomes devido as circunstâncias de sua descoberta (Massagué *et al.*, 2003; Itman *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2011) e tem como característica formar dímeros para sinalização. Cada subunidade contém sete resíduos de cisteínas conservados que apresentam três ligações dissulfeto intramoleculares e uma ligação intersubunidades (Itman *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2011).

Em mamíferos, os principais membros da superfamília TGF- β são : Nodal; TGF- β s 1-3 (codificadas por genes diferentes); activinas (formadas por dímeros de subunidades activina β , também conhecidas como subunidades inibina β); inibinas (formadas por subunidades de inibina α e inibina β); Proteínas morfogénicas ósseas (BMPs) e hormônio anti-mulleriano (AMH). Proteínas homólogas são encontradas em várias espécies, incluindo *Xenopus laevis*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Danio rerio* (Schier & Shen, 2000; Miyazama *et al.*, 2002; Shi & Massagué, 2003 Spiller *et al.*, 2017).

As proteínas da via TGF- β presentes na matriz extracelular se ligam à complexos de receptores de membrana serina/ tirosina quinase tipo I e tipo II. Os receptores tipo II possuem domínio extracelular para associação específica com os ligantes da superfamília TGF- β , são eles TGF- β RII para TGF- β s; ActRIIA/ActRIIB para Inibina, Activina e Nodal; BMPR-II e ActIIA/ActRIIB para BMPs e AMRH-II para o AMH (Massagué, 2000; Dijke *et al.*, 2002; Shi & Massagué, 2003; Fan *et al.*, 2011; Spiller *et al.*, 2017) (**Figura 3**).

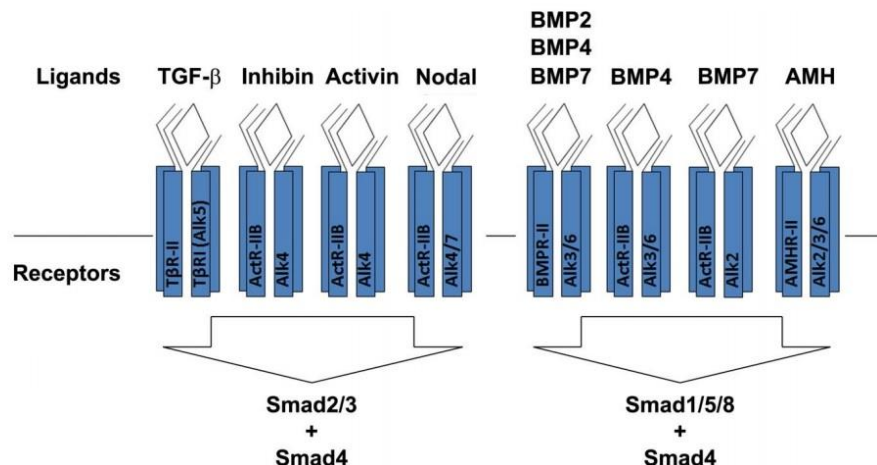


Figura 3: Representação esquemática da via de sinalização TGF- β . Cada ligante da superfamília TGF- β (TGF- β , Inibina, Activina, Nodal) e sua sinalização através de diferentes combinações de receptores de membrana Tipo I e Tipo II. Receptores tipo I incluem ALKs 2, 3, 4, 5, 6 e 7, os receptores Tipo II incluem TGF- β -RII; ActRIIA (não representada), ActRIIb, BMPRII e AMHRII. O complexo ativado fosforila efetores proteicos citoplasmáticos chamados Smads. As Smads (1, 2, 3, 5 e 8) após ativadas (fosforiladas) interagem com a Smad 4, formando um complexo que se transloca até o núcleo celular e junto a coativadores e corepressores regula a região promotora de mais de 500 genes. Adaptado de Shi & Massagué, 2003.

Os receptores tipo I são componentes *downstream* na via de sinalização e são denominados ALKs (*Activin receptor-like kinases*), sendo as ALKs 2, 4 e 7 formadoras do complexo ativado por Nodal e Activina; ALK 5 para TGF- β s; e ALK2, 3 e 6 para BMP e AMH (Figura 3) (Miyazama *et al.*, 2002; Zhao e Garbens *et al.*, 2002; Spiller *et al.*, 2017). A partir da formação do complexo ligante/receptor II e I ocorre uma cascata de fosforilações, iniciada com o receptor tipo II fosforilando o receptor tipo I que também por fosforilação ativa proteínas mediadoras citoplasmáticas chamadas Smads (Massagué *et al.*, 1998; Miyazama *et al.*, 2002) descritas a seguir (**Figura 4**).

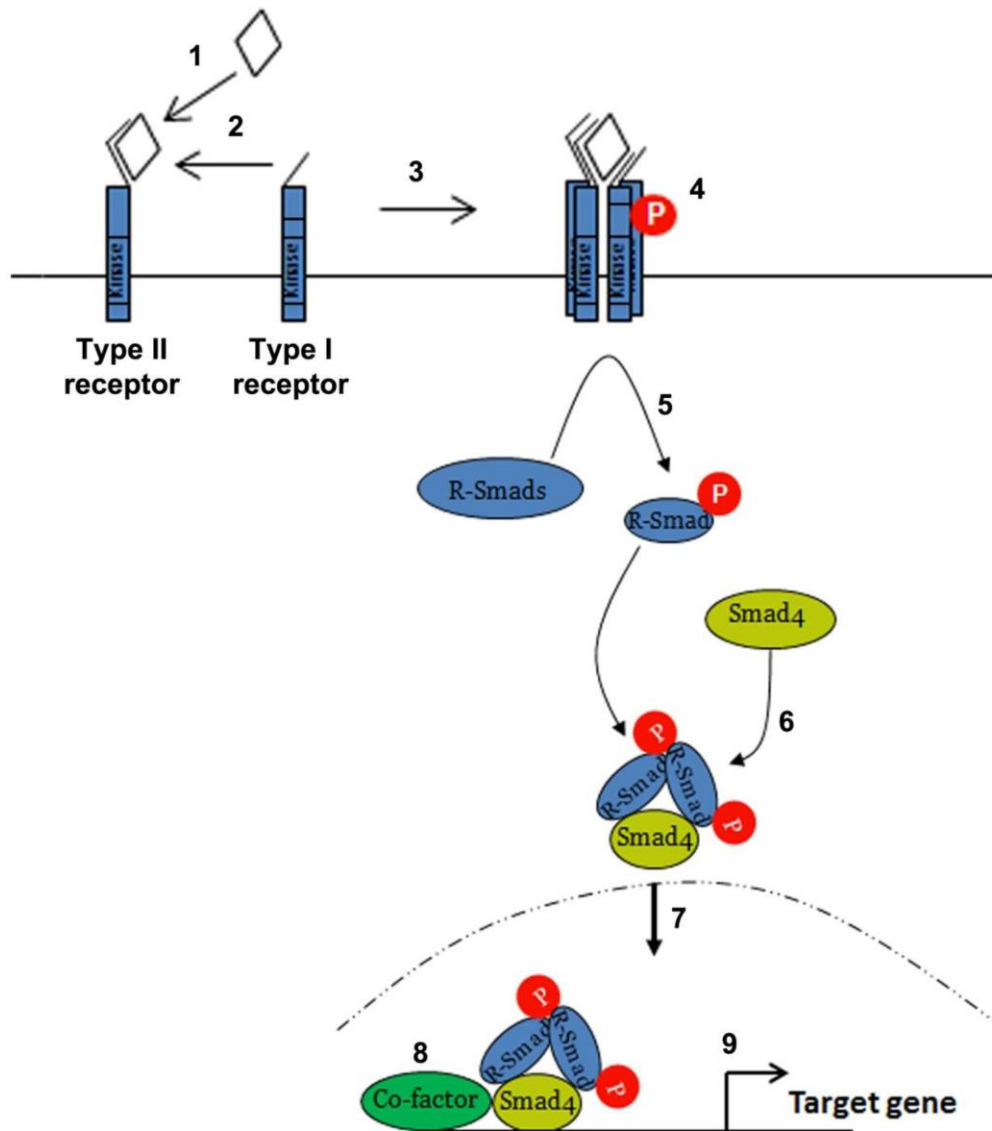


Figura 4: A via de sinalização transformante TGF- β . Um ligante da superfamília TGF- β se liga ao receptor tipo II (1) e recruta o receptor tipo I (2) levando à formação de um receptor complexo (3) e à fosforilação do receptor tipo I (4). Após a ativação, o receptor tipo I fosforila as SMADs reguladas por receptores (R-Smads) (5), permitindo que essas proteínas se associem com a Smad4 (6) e migrem para o núcleo (7). No núcleo, o complexo SMAD se associa com cofatores (8), e o complexo formado se liga a regiões regulatórias específicas em genes-alvo, ativando assim a transcrição (9). Adaptado de Massagué, 1998.

O termo “Smad” foi criado com a identificação da SMAD1 em humanos, dada sua homologia com as proteínas Sma de *Caenorhabditis elegans* e Mad de *Drosophila* (Liu *et al.*,

1996; Savage *et al.*, 1996). As Smads são divididas em 3 grupos de acordo com sua função. As R-Smads estão associadas aos receptores tipo I e realizam a mediação de sinal da membrana em direção ao núcleo, são elas Smads 1, 2, 3, 5 e 8. A Co-smad (Smad 4) cuja função é se ligar as R-Smads no citoplasma, carreando-as para o núcleo celular. E por fim, as I-Smads (Smads 6 e 7) antagonistas das R-Smads e que apresentam atividade inibitória sob estímulos específicos (Itman *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006; Spiller *et al.*, 2017).

As R-Smads são ativadas pelo complexo ligante/receptor tipo I e II de acordo com uma distribuição que nos permite agrupar à via TGF- β em duas grandes subfamílias (Vogt *et al.*, 2011, Spiller *et al.*, 2017). A subfamília TGF- β tem como mediadores as R-Smads (2 e 3) e como ligantes as TGF- β s, Inibina, Activina e Nodal; e a subfamília BMP que tem sua sinalização mediada pelas R-Smads (1, 5 e 8) e os ligantes BMPs e AMH. Em comum a ambos, a Smad 4 transporta as R-Smads fosforiladas (1, 2, 3, 5 e 8) do citoplasma para o núcleo celular; esse conjunto levado ao DNA genômico atua na regulação da expressão gênica, em associação à Coativadores, Corepressores e demais reguladores transcricionais (Lin *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2003; Massagué, 2003).

1.3 Mecanismos regulatórios da espermatogênese

A espermatogênese em vertebrados é regulada principalmente por gonadotropinas e esteroides sexuais que são os principais hormônios reprodutivos. As Gonadotropinas são produzidas na hipófise, sendo elas o hormônio folículo estimulante (Fsh) e hormônio luteinizante (Lh) (Schulz & Nobrega, 2011; Moraes *et al.*, 2017). Em mamíferos, o FSH atua exclusivamente em seus receptores presentes nas células de Sertoli (Heckert & Griswold, 1991 e 1993), estimulando a auto-renovação das espermatogônias tronco através do GDNF (*glial-derived neutrophic factor*), uma proteína pertencente a superfamília TGF- β produzida

pelas células de Sertoli. (Yomogida *et al.*, 2003; Savitt *et al.*, 2012). Enquanto o Lh, através do receptor de LH, regula a produção de andrógenos nas células de Leydig (Heckert & Griswold, 1991 e 1993).

Em teleósteos, tanto as células de Sertoli quanto as células de Leydig apresentam receptores para o Fsh (Ohta *et al.*, 2007; Chauvigne *et al.*, 2012; Nóbrega *et al.*, 2015). O Fshr em peixes também pode ser estimulado pelo Lh (promiscuidade do receptor), entretanto requer altas concentrações de Lh que ocorrem em situações fisiológicas específicas como época de desova e ovulação (ver revisão Schulz *et al.*, 2010). Teoricamente, o Lhr também pode ser ativado pelo Fsh, mas em níveis de concentrações acima dos níveis fisiológicos, podem ser considerados Lh específico (Andersson *et al.*, 2007; ver revisão Schulz *et al.*, 2010). O Fshr presente nas células de Leydig torna o Fsh um estimulante da androgênese, em particular da produção do 11 Keto-testosterona (11-KT) (Ohta *et al.*, 2007; García-López *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2010).

Diferentemente dos mamíferos, o Fsh apresenta papel de pró-diferenciação na espermatogênese dos peixes teleósteos (Schulz *et al.*, 2010; Nóbrega *et al.*, 2015). Evidências mostram que este papel pode ocorrer de forma independente de andrógenos. Nóbrega e colaboradores (2015) mostraram que o Fsh na presença do trilostano, inibidor da enzima 3- β -hidroxiesteroide desidrogenase (chave na esteroidogênese) promoveu a diferenciação espermatogonial. A análise de expressão gênica nesse mesmo trabalho, mostrou que o gene fator de crescimento semelhante a insulina 3 (*igf3*), produzido pelas células de Sertoli e unicamente encontrado em peixes, estava altamente expresso. De forma parecida, o peptídeo semelhante a insulina 3 (*insl3*) produzido pelas células de Leydig, também teve sua expressão aumentada na influência de Fsh e trilostano. Em mamíferos, o gene *INSL3* é responsável pela descida dos testículos (Nef & Parada, 1999), sua função ainda é pouco conhecida em peixes.

Em zebrafish, Assis e colaboradores (2016) e Crespo e colaboradores (2016) demonstraram um papel de pró-diferenciação espermatogonial para o *Insl3*.

Um terceiro fator de crescimento envolvido na regulação do nicho espermatogonial é o hormônio Anti-Mülleriano (*Amh*). O AMH é um membro da superfamília TGF- β , que em mamíferos tem papel central na regressão do ducto de Müller durante a diferenciação sexual masculina de tetrápodes, além de estar envolvido na síntese de esteroides (Josso *et al.*, 2006). O *Amh* é sintetizado nas células de Sertoli e atuante nas células de Leydig; em Zebrafish, o *Amh* bloqueia a diferenciação espermatogonial, mantendo as espermatogônias indiferenciadas em seu estado quiescente. Além disso, atua nas células de Leydig inibindo a esteroidogênese (Skaar & Nóbrega *et al.*, 2011). Diferentemente dos genes *igf3* e *insl3*, o *amh* é regulado negativamente pelo Fsh (Skaar *et al.*, 2011), esta redução na expressão do *amh*, cria uma condição permissiva à diferenciação estimulada pelo *Igf3* e *Insl3* sob influência do Fsh (Skaar *et al.*, 2011; Morais *et al.*, 2017) (**Figura 5**).

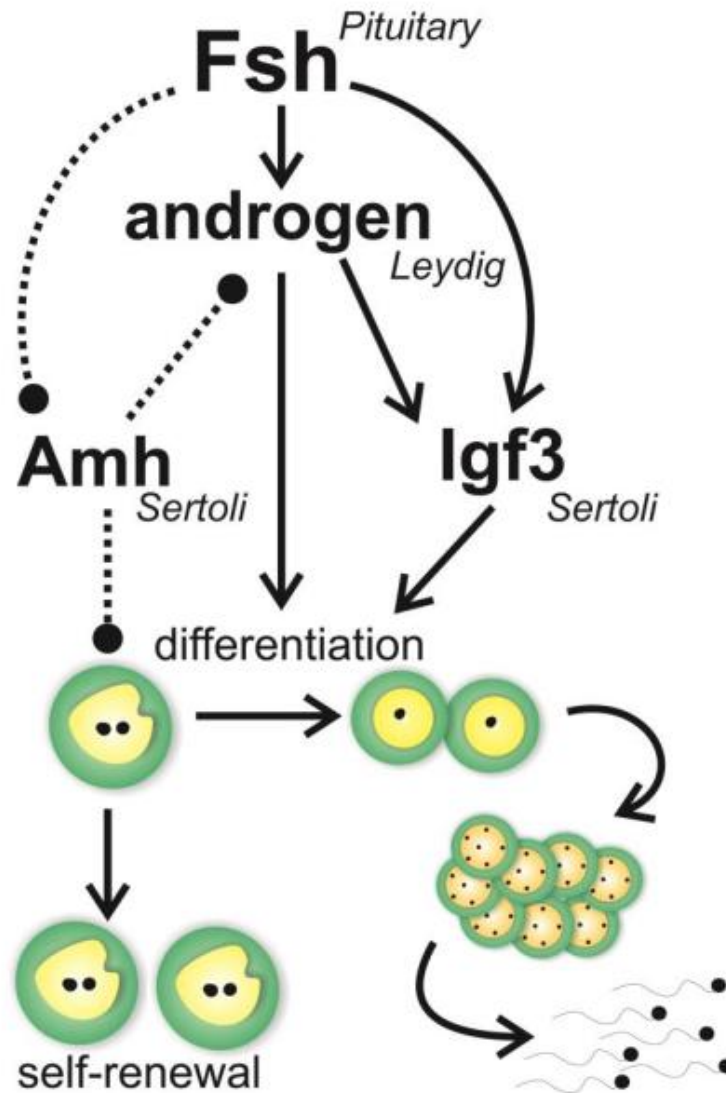


Figura 5: Representação esquemática do papel do Fsh na espermatogênese de zebrafish. O Fsh estimula a produção de andrógenos através das células de Leydig, o que por sua vez promove a diferenciação celular. Ao mesmo tempo, o Fsh reduz a expressão do *amh* nas células de Sertoli, resultando em diferenciação espermatogonial. O Fsh também estimula a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina 3 (Igf3) pelas células de Sertoli. Andrógenos, de forma menos pronunciada também estimulam a produção de Igf3. Retirado de Nóbrega *et al.*, 2015.

Além dos fatores de crescimento, outros fatores produzidos e secretados pela célula de Sertoli que exercem papel na regulação das espermatogônias tronco de mamíferos, são: Activina A e B, BMP4 (Proteína morfogenética óssea 4) (Loveland & Robertson, 2005) e

TGF- β (1-3). Dentre os membros da superfamília TGF- β produzidos pelas células de Sertoli, apenas as TGF- β (1-3) apresentam regulação exclusivamente autócrina, os demais ligantes atuam nas células germinativas. O ligante Nodal é produzido pelas espermatogônias e tem ação autócrina, regulando positivamente o gene de pluripotência *nanog* (Miles *et al.*, 2013); as BMPs também mantêm o estado de pluripotência, com exceção da BMP4 que é promotora de diferenciação (Itman *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2011). As Activinas mantêm quiescência das espermatogônias durante a formação gonadal no período de desenvolvimento fetal de camundongos (Spiller *et al.*, 2017), enquanto que a activina A atuou como fator de diferenciação no mesmo modelo experimental (Fan *et al.*, 2011). Em diferentes tipos celulares as TGF- β (1-3) mantêm as células em quiescência, na fase G1 da mitose (Dijke *et al.*, 2002).

Estudos com inibidores farmacológicos forneceram evidências a respeito do papel das duas cascatas (mediadas por Smad 2, 3 e mediadas por Smads 1, 5 e 8) da via de sinalização TGF- β . Souquet e colaboradores (2012) e Wu e colaboradores (2013) encontraram resultados semelhantes em culturas de testículos em desenvolvimento fetal, utilizando o inibidor SB431542, bloqueador da subfamília TGF- β (TGF- β , Activina e Nodal) da via TGF- β . Em ambos os experimentos, o bloqueio da fosforilação das Smads 2 e 3 provocou aumento de expressão de genes marcadores de meiose (γ -H2AX e SYCP3) (Souquet *et al.*, 2012) e Stra8, Rec8 e Dmc1 (Wu *et al.*, 2013). De forma contrária, Wong e colaboradores (2013) utilizando o inibidor *dorsomorphin* (inibidor da via da subfamília BMP) em testículos de zebrafish, encontraram favorecimento da proliferação de espermatogônias. O mesmo efeito na espermatogênese de zebrafish foi visto por Neumann e colaboradores (2011), através da mutação do receptor ALK 6 da via da subfamília BMP. Desta forma, o bloqueio das vias das subfamílias (TGF- β /Inibina/Activina/Nodal e BMP) aponta para um papel antagônico entre esses dois ramos da via TGF- β .

2. Justificativa

A espermatogênese é um processo altamente organizado, cujo funcionamento adequado garante a transmissão da informação genética para a próxima geração, e assim determinante para a continuidade da espécie (Zhao & Garbers, 2002). A manutenção do nicho espermatogonial requer mecanismos altamente regulados de controle genético, mediados por fatores autócrinos e parácrinos, que regulam diferentemente genes em momentos específicos (Loveland & Hime, 2005; Fan *et al.*, 2011;)

Dito isso, a via de sinalização TGF- β por mediar processos celulares fundamentais para a função testicular (auto-renovação e diferenciação) em mamíferos, além de seu papel central durante as etapas de desenvolvimento embrionário e regulações metabólicas pós-ontogênese nos metazoários, a torna de suma importância para a maior compreensão do processo espermatogênico (Fan *et al.*, 2011; Miles *et al.*, 2013; Spiller *et al.*, 2017). Além disso, o entendimento do papel da superfamília TGF- β é ainda mais incipiente na reprodução de peixes teleósteos. Uma abordagem muito valiosa para o entendimento da função testicular é a utilização de inibidores específicos de vias de sinalização. Diversos inibidores para a via da subfamília TGF- β (TGF- β , Inibina, Actina e Nodal) foram desenvolvidos (Tojo *et al.*, 2015; Vogt *et al.*, 2011). No entanto, nenhum desses inibidores foram utilizados em cultura de testículos de teleósteos. Dentre esses inibidores, o A83-01 anulou satisfatoriamente as ALKs 4, 5 e 7 em cultura de células epiteliais, inibindo todo ramo maior da via TGF- β (Tojo *et al.*, 2015). Desta forma, a utilização do inibidor A83-01 poderá fornecer informações valiosas à respeito da via TGF- β e seu papel no processo espermatogênico de teleósteos, em especial do zebrafish. Da mesma forma, a avaliação funcional do Fsh na via de sinalização TGF- β pode agregar aspectos importantes sobre essa sinalização e sua influência no nicho espermatogonial de teleósteos.

3. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi determinar o efeito da inibição da subfamília TGF- β (TGF- β , Inibina, Activina, Nodal,) da via TGF- β no nicho espermatogonial por meio do inibidor A83-01 em culturas de testículos de zebrafish em situação basal e estimuladas por Fsh. No intuito de elucidar os possíveis papéis desta sinalização na regulação do processo espermatogênico (auto-renovação ou diferenciação), foram realizadas análises quantitativas das células da linhagem germinativa e avaliação da expressão de genes marcadores de células-tronco, diferenciação espermatogonial, Smads e fatores de crescimento.

Os Objetivos específicos foram:

1. Inibir o ramo da subfamília TGF- β (TGF- β , Inibina, Activina, Nodal) através da inativação dos receptores tipo I (ALKs 4,5,7) por meio do inibidor A83-01 em presença e ausência do Fsh em culturas de testículos.
2. Avaliar a expressão dos seguintes genes: marcadores de espermatogônias tronco (*pou5f3*, *nanos3*, *nanog*, *gfra1a*); diferenciação (*dazl*); fatores de crescimento (*amh*, *igf3*, *insl3*) e sinalizadores da via TGF- β (*Smad2*, *smad3a* e *smad3b*) em culturas de testículos tratados com A83-01 na ausência ou presença de Fsh após 18h e 7 dias de cultura.
3. Avaliar a expressão das Smads em estimulação ao Fsh em ausência do inibidor A83-01 após 18h
4. Avaliar por meio de análise morfológica, o efeito do inibidor A83-01 após 7 dias de cultura na presença ou ausência de Fsh.

5. Material e Métodos

Animais

Machos sexualmente maduros de zebrafish (*D. rerio*), provenientes da loja Fauna e Flora-Botucatu comércio de peixes, foram aclimatados e alocados no Biotério de Peixes do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu. A água do aquário foi mantida em 27,5°C e fotoperíodo controlado (14 h de claro e 10h de escuro). Esse trabalho foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA-666) do Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Cultura de testículos

Para determinar o efeito do inibidor A83-01 (Sigma) no nicho espermatogonial, foram realizadas culturas de tecido *in vitro* conforme descrito por Leal e colaboradores (2009) (**Figura 6**). Os animais (n=48) foram eutanasiados por imersão em solução de Benzocaína a 1%, seus testículos foram dissecados, removidos e cultivados em meio de cultura *Leibovitz* (L-15), contendo os respectivos tratamentos abaixo descritos.

Para avaliar os efeitos do inibidor A83-01, testículos de zebrafish (n=16 animais) foram incubados em 1µM A83-01 e seus contralaterais em L-15 somente, por 18 horas (n=8 animais) e 7 dias (n=8 animais, com troca de meio após 3 dias) à 28°C. As culturas de 18 horas e 7 dias foram realizadas em placas de 96 *well* (contendo 200 µL de solução) e 24 *well* (contendo 750 µL de solução), respectivamente. Após esse período todos os testículos foram coletados para análise expressão gênica. No intuito de verificar a influência do A83-01 na estimulação por Fsh, testículos (n=24 animais) foram incubados com 100ng/mL de rzf Fsh (recombinante de zebrafish, rzf) na presença ou ausência de 1µM A83-01 por 18 horas (n=8 animais) e 7 dias (n=16 animais). Após o período mencionado os testículos foram coletados para análise de expressão gênica (n=16 animais; sendo n=8 animais da cultura de 18h e n=8

animais da cultura de 7 dias) e morfológica (n=8 animais). Para verificar a expressão das Smads em estimulação ao Fsh em ausência do inibidor A83-01, testículos (n=8 animais) foram incubados com 100ng/mL de rzf Fsh e seus contralaterais em L-15 somente, por 18 horas. A concentração de 100ng/mL foi baseada em estudos anteriores de Nóbrega e colaboradores (2015). No tratamento com A83-01 foi administrado DMSO (0,001% v/v) e em seus respectivos controles.

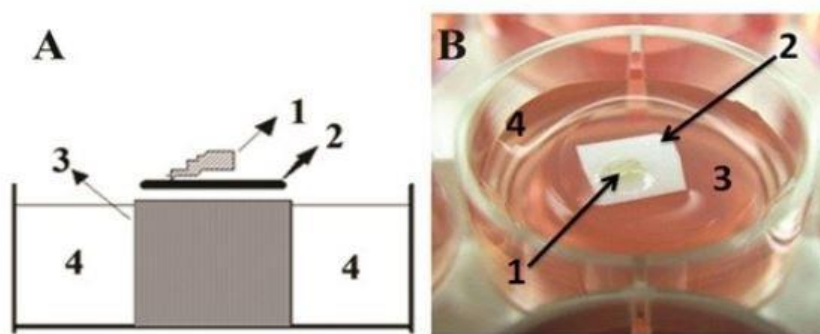


Figura 6: Esquema (A) e fotografia (B) exemplificando a cultura de testículos de zebrafish: 1- testículo; 2-membrana de nitrocelulose; 3- bloco de agarose; 4-poço com o meio de cultura. Adaptado de Leal e colaboradores (2009).

Expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) e Análise morfológica

As amostras (18h e 7 dias) destinadas à expressão gênica tiveram seu RNA total extraído utilizando-se o Kit comercial RNA aqueous-Micro Kit (Ambion), seguido de tratamento com Dnase e síntese de cDNA de acordo com especificações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A análise de expressão gênica foi realizada por qPCR, *primers* (*foward e reverse*) específicos para os genes alvos e gene de referência (β -actina) foram utilizados. (Tabela 1). Para cada gene de interesse os níveis de RNAm (Cts) foram normalizados pelo gene de referência (β -actina) (Δ Ct), e posteriormente expressos como valores relativos à média dos Cts ($\Delta\Delta$ Ct) do grupo controle pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os Cts foram

determinados através de Step One Plus (Applied Biosystems) em reações de 20 µl, utilizando-se Syber Green como master mix. Os níveis relativos de RNA foram expressos como *fold induction* do grupo controle.

Amostras destinadas à análise morfológica foram fixadas em *Karnovsky* (glutaraldeído 4% paraformoldeído 8% em tampão fosfato pH 7,2), e processadas para historesina (Technovit 7100), seccionadas com 3µm e corados com azul de toluidina-bórax conforme procedimentos usuais de histologia. A análise histológica foi realizada por quantificação de cistos de espermatogônias indiferenciadas (Aund), espermatogônias tipo A diferenciadas (Adiff) e espermatogônias tipo B, em 100 campos aleatórios de lâminas com cortes não seriados. Utilizando critérios morfológicos já estabelecidos na literatura para células germinativas de zebrafish, como tamanho do núcleo e número de células germinativas por cisto (Leal et al., 2009; Schulz et al., 2010; Morais et al., 2013). Para tanto, foram utilizados um microscópio acoplado a uma câmara JVC e um computador com o programa Leica QWIN.

Tabela 1. <i>Primers</i> usados para análise de expressão gênica em tempo real qPCR		
Gene	Sequencia dos primers (5'-3') Fw Rv	Função
<i>pou5f3 (Oct4)</i>	GAGAGATGTAGTGCGTGTAT GCTCGTAATACTGTGCTTCA	Marcador de célula-tronco
<i>nanos3</i>	GCTCATGGATCTATGGAGAC GTCTGAATCCGCGTCAGATT	Marcador de célula-tronco
<i>nanog</i>	TGTCCTACAACAAGACTGAGCC CAGGAATCTGGCGTGTGGG	Marcador de célula-tronco
<i>gfra1a</i>	TCGACTGGCTCCCATCTATTC AGGTGTCATTCAGGTTGCAGG	Marcador de célula-tronco

<i>dazl</i>	AGTGCAGACTTTGCTAACCCTTATGTA GTCCACTGCTCCAAGTTGCTCT	Marcador de diferenciação
<i>amh</i>	CTCTGACCTTGATGCCTCATTT GGATGTCCCTTAAGAACTTTTGCA	Fator de crescimento
<i>igf3</i>	TGTGCGGAGACAGAGGCTTT CGCCGCACTTTCTTGGATT	Fator de crescimento
<i>insl3</i>	TCGCATCGTGGGAGTTT TGCACAACGAGGTCTCTATCCA	Fator de crescimento
<i>smad2</i>	TCTAACTCCACCTGCCCAGA CCGCTTGAACCACTAGCAGA	Via de sinalização TGF- β
<i>smad3a</i>	TATTCCCATGCTCTAATCAG CAGTTCAGCGTTCCTCTATT	Via de sinalização TGF- β
<i>smad3b</i>	ATGGGAAGGCAAAACAGCCT GCTCCATGAGTGTCACCGTT	Via de sinalização TGF- β
<i>b-actin</i>	CGAGCTGTCTTCCCATCCA TCACCAACGTAGCTGTCTTCTG	Gene de referência

Análise estatística

Os resultados foram expressos através da média $\pm$ EP (erro padrão). As diferenças estatísticas ($p < 0.05$) foram detectadas pelo software Graph pad Prism 4.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA, <http://www.graphpad.com>) por meio de teste-t pareado para comparações entre dois grupos/parâmetros.

6. Resultados

Efeitos do inibidor A83-01 na expressão gênica de culturas de testículos cultivados em condições basais

Os efeitos do inibidor farmacológico da subfamília TGF- β foram avaliados em culturas de testículos de zebrafish cultivados em condições basais (L-15 somente) por 18h e 7 dias. O intuito deste experimento foi avaliar o efeito isolado do inibidor. Para tanto, a expressão relativa de alguns genes foi avaliada. Após 18h de cultivo com o inibidor, observam-se alterações na expressão de alguns genes (**Figura 7**). A expressão relativa dos genes de

espermatogônias tronco (A_{und*}/A_{und}), *pou5f3* e *nanog*, mostra-se elevada na presença do inibidor em relação às condições basais de cultura (**Figura 7**). De forma contrária, os transcritos primários do *igf3* e *smad3b* encontraram-se diminuídos após 18h de exposição ao inibidor (**Figura 7**). Além disso, nota-se uma relação inversamente proporcional entre a expressão do *amh* e *igf3* (**Figura 7**). No entanto, o aumento do *amh* não foi significativo (**Figura 7**). Diferentemente do que foi observado nas culturas de testículos tratados com A83-01 por 18h, a exposição com 7 dias ao inibidor farmacológico da subfamília TGF- β mostrou que nenhum gene de espermatogônia tronco teve sua expressão alterada em relação ao grupo cultivado apenas em L-15 (**Figura 8**). Diferentemente da cultura de 18h, os níveis relativos de RNAm de *igf3*, *insl3*, *smad3a* e *smad3b* apresentaram-se aumentados na presença do inibidor nas culturas de 7 dias (**Figura 8**). Interessantemente, o gene de diferenciação espermatogonial, *dazl*, também teve sua expressão significativamente aumentada nos testículos cultivados com o inibidor por 7 dias (**Figura 8**).

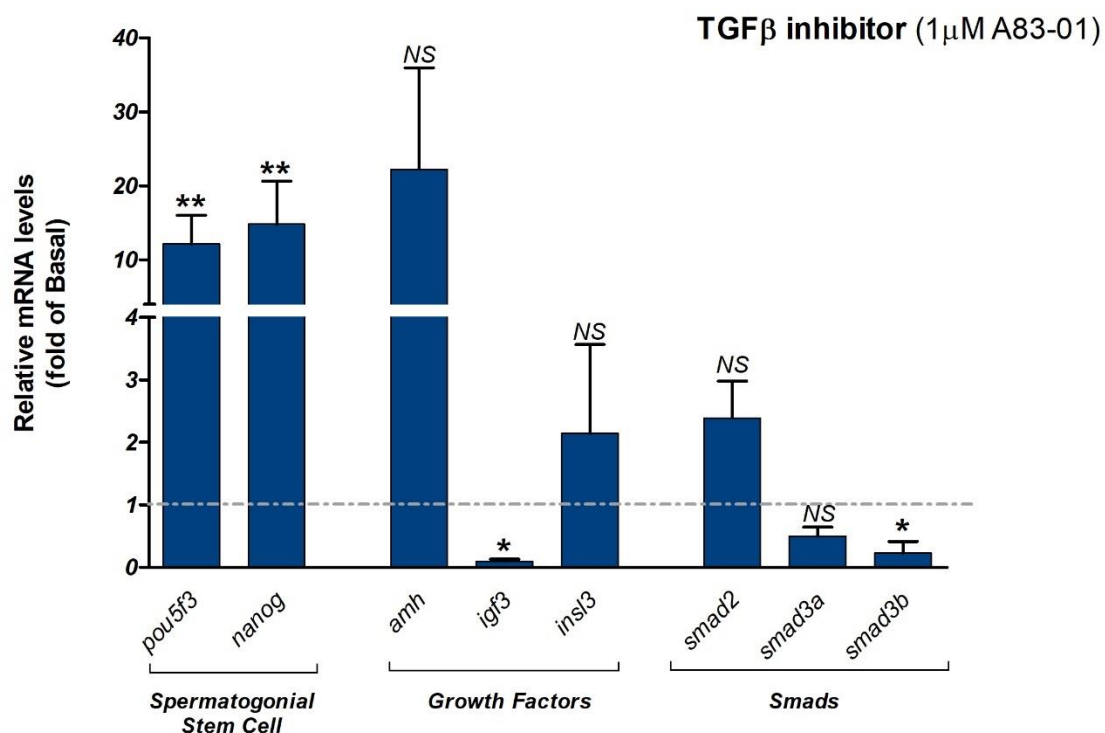


Figura 7. Expressão relativa dos genes alvos de espermatogônias tronco (*pou5f3*, *nanog*), fatores de crescimento (*amh*, *igf3*, *insl3*) e mensageiros intracelulares da subfamília TGF- β (*smad2*, *smad3a*, *smad3b*) em culturas de testículos tratados com inibidor A83-01(1 μ M) após 18h de cultivo. Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (*β -actina*) e expressos relativos ao grupo basal (L-15 somente). (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$), (**) representa diferença significativa ($p < 0,01$), (NS) sem diferença significativa. Os dados estão apresentados com a média $\pm$ erro padrão ($n=8$) e como *fold induction* do controle (condição basal, ou seja, testículos cultivados apenas em L-15) representado pela linha tracejada.

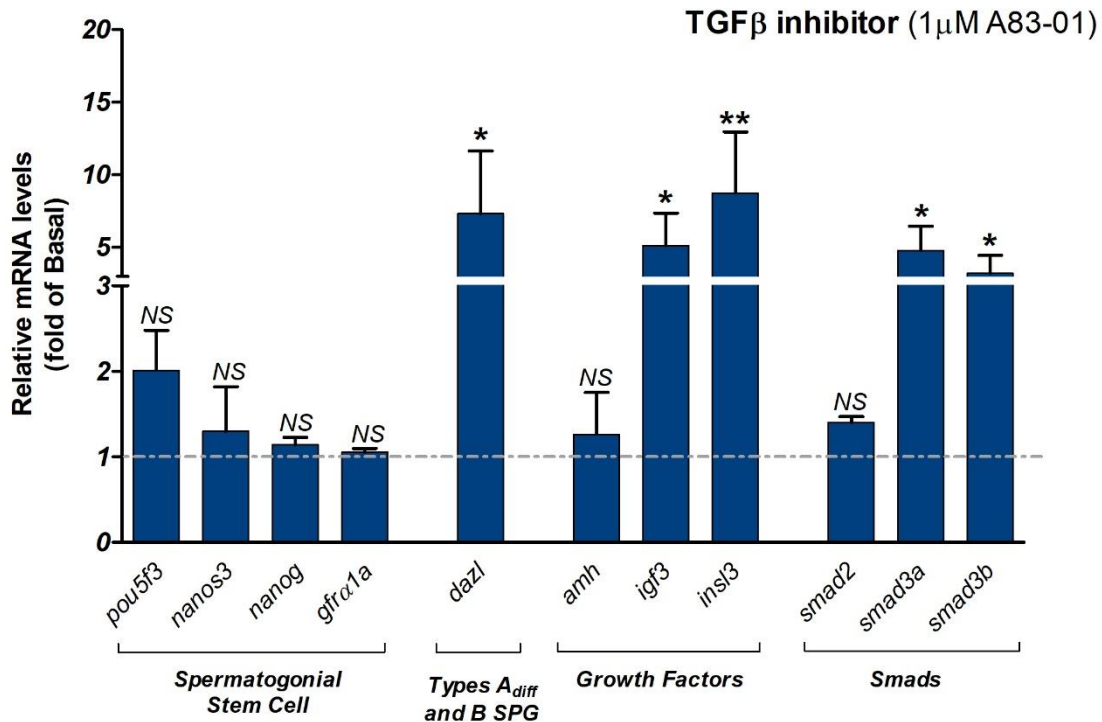


Figura 8. Expressão relativa dos genes alvos de espermatogônias tronco (*pou5f3*, *nanog*, *nanos3* e *gfra1a*), diferenciação espermatogonial (*dazl*), fatores de crescimento (*amh*, *igf3*, *insl3*) e mensageiros intracelulares da subfamília TGF β (*smad2*, *smad3a*, *smad3b*) em culturas de testículos tratados com inibidor A83-01(1 μ M) após 7 dias de cultivo. Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (β -actina) e expressos relativos ao grupo basal (L-15 somente). (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$), (**) representa diferença significativa ($p < 0,01$), (NS) sem diferença significativa. Os dados estão apresentados com a média $\pm$ erro padrão ($n=8$) e como *fold induction* do controle (condição basal, ou seja, testículos cultivados apenas em L-15) representado pela linha tracejada.

Efeitos do inibidor A83-01 na expressão gênica de culturas de testículos estimulados com rzf Fsh

Estudos em zebrafish têm demonstrado que o Fsh atua como importante regulador das fases iniciais da espermatogênese do zebrafish, em especial estimulando a proliferação e diferenciação espermatogonial através da modulação de fatores de crescimento estimulatórios (por exemplo Igf3, Ins13, andrógenos) e inibitórios (por exemplo Amh). Com base nisso, testículos de zebrafish foram cultivados com rzf Fsh (100 ng/mL) na presença ou ausência do A83-01 por 18h e 7 dias. O objetivo destes experimentos foi avaliar o efeito da inibição

farmacológica da subfamília TGF- β em testículos estimulados por rzf Fsh. Os resultados das culturas de 18h mostram que o co-tratamento (rzf Fsh + A83-01) aumenta os níveis dos transcritos primários de *nanog*, assim como os dos fatores de crescimento (*igf3*, *amh* e *insl3*) (**Figura 9**). No co-tratamento de 18h, apenas a *smad3a* apresentou diminuição em sua expressão quando comparada com os testículos apenas cultivados com rzf Fsh (**Figura 9**). Já na cultura por 7 dias, o co-tratamento rzf Fsh + inibidor reduziu significativamente a expressão de genes de espermatogônias tronco, *pou5f3* e *nanog*, enquanto que aumentou a expressão do gene relacionado à diferenciação espermatogonial (*dazl*) (**Figura 10**). Interessantemente, os transcritos primários dos fatores de crescimento *amh* e *igf3* continuaram significativamente elevados no co-tratamento por 7 dias (**Figura 10**). Diferentemente da cultura de 18h, *smad3a* apresentou aumento de expressão no co-tratamento por 7 dias quando comparada com sua expressão nos testículos cultivados apenas com rzf Fsh por 7 dias (**Figura 10**). Os níveis de expressão de *nanos3* e *gfra1a* não variaram em relação ao grupo controle, da mesma forma que a *smad2* (**Figura 10**).

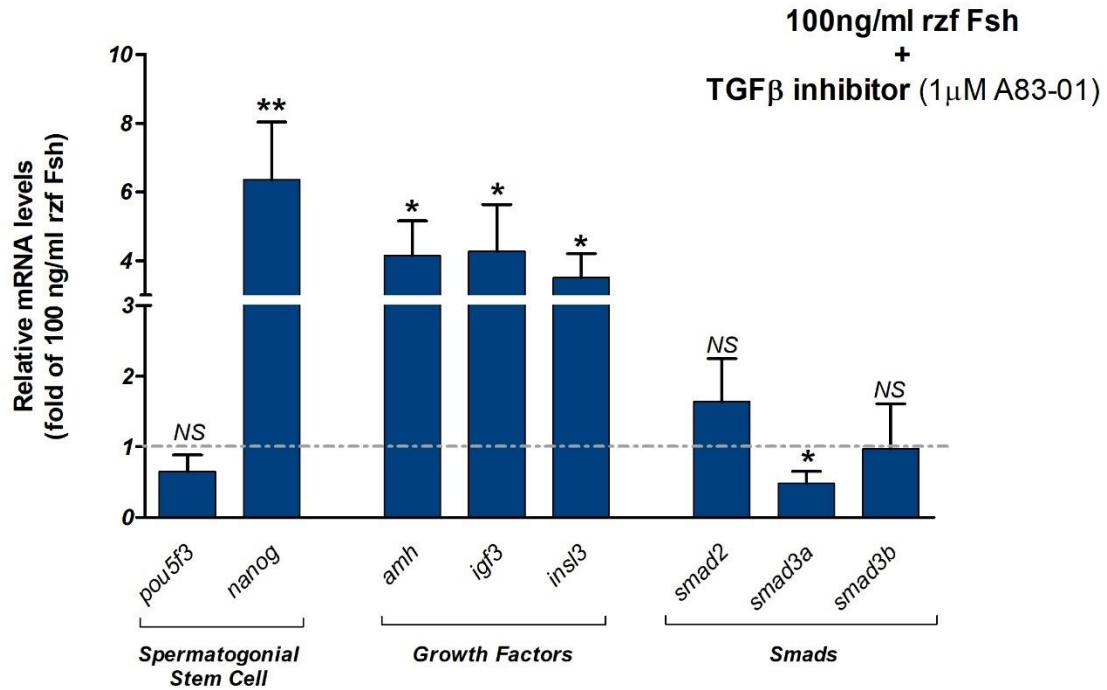


Figura 9. Expressão relativa dos genes alvos de espermatogônias tronco (*pou5f3*, *nanog*), fatores de crescimento (*amh*, *igf3*, *insl3*) e mensageiros intracelulares da subfamília TGFβ (*smad2*, *smad3a*, *smad3b*) em culturas de testículos co-tratados com rzf Fsh (100ng/mL) e inibidor A83-01(1μM) após 18h de cultivo. Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (β-actina) e expressos relativos ao grupo controle (rzf Fsh). (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$), (**) representa diferença significativa ($p < 0,01$), (NS) sem diferença significativa. Os dados estão apresentados com a média $\pm$ erro padrão (n=8) e como *fold induction* do controle (condição basal, ou seja, testículos cultivados apenas com rzf Fsh) representado pela linha tracejada

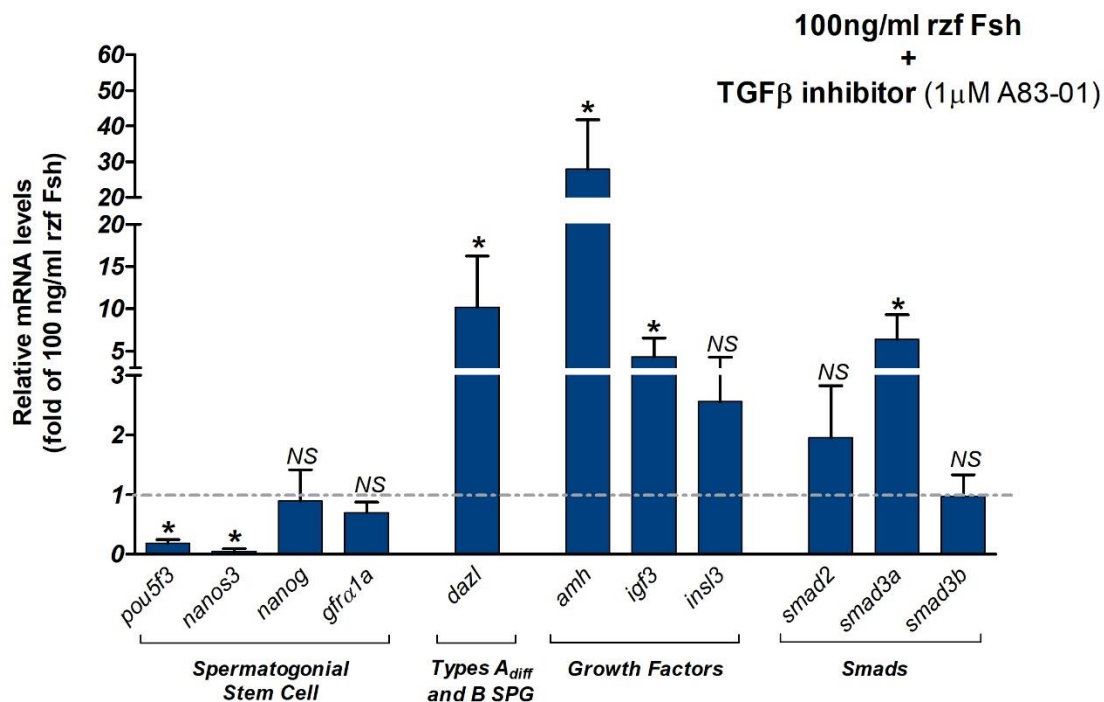


Figura 10. Expressão relativa dos genes alvos de espermatogônias tronco (*pou5f3*, *nanog*, *nanos3* e *gfra1a*), diferenciação espermatogonial (*dazl*), fatores de crescimento (*amh*, *igf3*, *insl3*) e mensageiros intracelulares da subfamília TGF β (*smad2*, *smad3a*, *smad3b*) em culturas de testículos co-tratados com rzf Fsh (100ng/mL) e inibidor A83-01(1 μ M) após 7 dias de cultivo. Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (β -actina) e expressos relativos ao grupo basal (rzf Fsh). (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$), (NS) sem diferença significativa. Os dados estão apresentados com a média $\pm$ erro padrão ($n=8$) e como *fold induction* do controle (condição basal, ou seja, testículos cultivados apenas com rzf Fsh) representado pela linha tracejada.

Efeitos do inibidor A83-01 na morfologia e frequência espermatogonial de culturas de testículos estimulados com rzf Fsh

Os efeitos do inibidor farmacológico da subfamília TGF- β nas diferentes gerações espermatogoniais em testículos cultivados com rzf Fsh foram avaliados morfologicamente e morfometricamente através da frequência de cistos espermatogoniais (A_{und} , A_{diff} e B). O co-tratamento de rzf Fsh + A83-01 por 7 dias aumentou a frequência de cistos de espermatogônias diferenciadas e reduziu os cistos de espermatogônias indiferenciadas em

comparação com testículos cultivados apenas com rzf Fsh (**Figura 11**). A frequência de espermatogônias do tipo B não sofreu alteração entre os grupos avaliados (**Figura 11**).

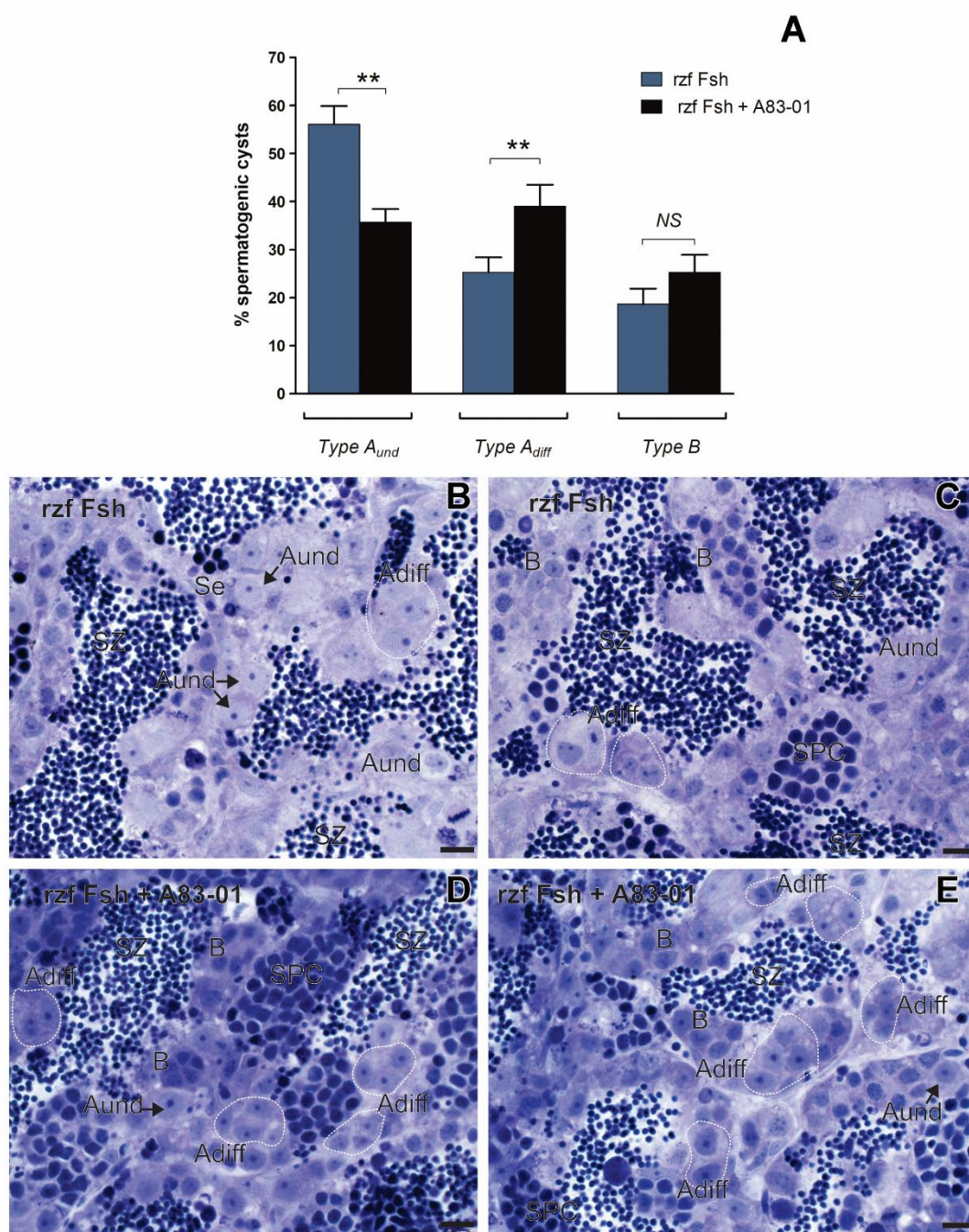


Figura 11. (A) Frequência dos cistos espermatogênicos em culturas de testículos de zebrafish, após 7 dias de incubação na presença de 100ng/mL de rzf Fsh ou presença de 100ng/mL de rzf Fsh mais 1 μ M

do inibidor da via TGF- β , A83-01. Os asteriscos (**) representam diferenças ($p < 0,01$) observadas entre os grupos para cada um dos diferentes tipos de cistos investigados, (NS) sem diferença significativa. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão ($n=6$). (B-E) Morfologia dos explantes de testículos de zebrafish após 7 dias de incubação (B-C) na presença de 100ng/mL de rzf Fsh ou (D-E) presença de 100ng/mL de rzf Fsh + 1 μ M do inibidor da via TGF- β , A83-01. Coloração azul de toluidina. A linha pontilhada branca delimita os cisto de espermatogônias tipo A diferenciadas (A_{diff}). A_{und} = cistos de espermatogônias do tipo A indiferenciadas, B = cistos de espermatogônias do tipo B, SPC = cistos de espermatócitos, SZ = espermatozoides, SE = células de Sertoli. Barra de escala = 10 μ m.

Efeitos do Fsh na expressão das diferentes *smads* em culturas de testículos

No intuito de avaliar os efeitos do Fsh na expressão das diferentes *smads*, testículos de zebrafish foram cultivados com rzf Fsh (100 ng/mL) por 18h e coletados para análises de expressão gênica. O rzf Fsh foi capaz de aumentar a expressão gênica apenas da *smad3b* (**Figura 12**). Também, foi comparada a relação entre a expressão das *smads* nos testículos cultivados em L-15 somente (condição basal). Interessantemente, a *smad2* apresentou maior expressão em relação às demais *smads* testiculares (**Figura 13**).

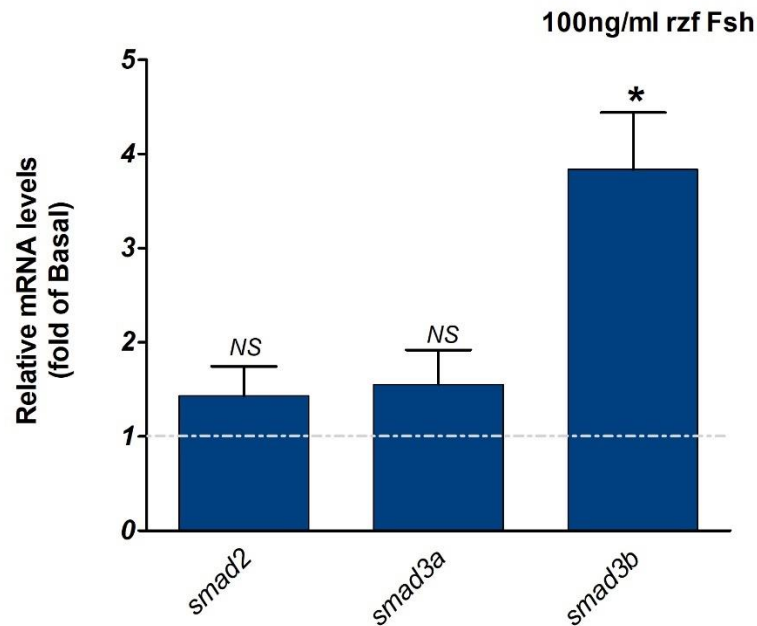


Figura 12. Expressão relativa das diferentes *smads* (*smad2*, *smad3a* e *smad3b*) em culturas de testículos de zebrafish cultivados com rzf Fsh (100 ng/mL) por 18h. Os Cts foram normalizados pelo gene de referência (β -actina) e expressos relativos ao grupo controle (L-15 somente). (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$), (NS) sem diferença significativa. Os dados estão apresentados com a média $\pm$ erro padrão ($n=8$) e como *fold induction* do controle (condição basal, ou seja, testículos cultivados apenas em L-15) representado pela linha tracejada.

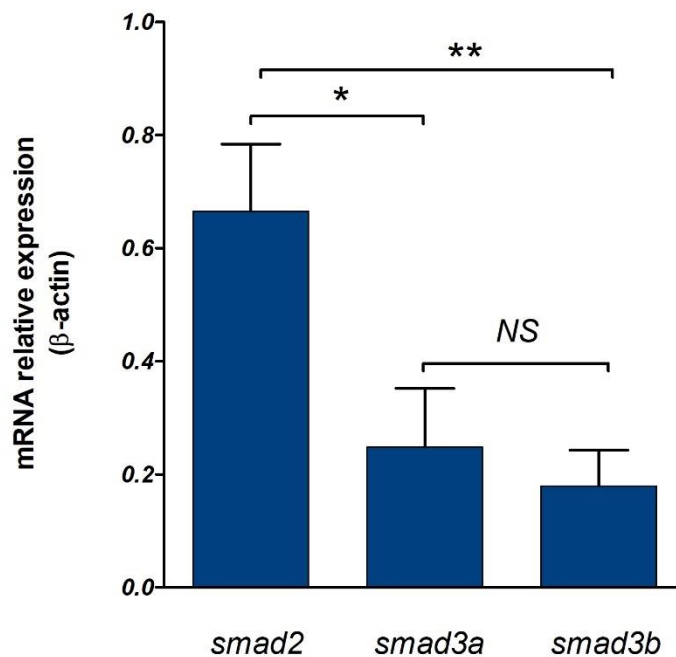


Figura 13. Expressão relativa das diferentes *smads* (*smad2*, *smad3a* e *smad3b*) em culturas de testículos de zebrafish cultivados com L-15 por 18h. Os Cts foram normalizados pelo gene de

referência (*β-actina*) e expressos relativos à média dos dCTs de todas as *smads* avaliadas. (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$), (**) representa diferença significativa ($p < 0,01$), (NS) sem diferença significativa. Os dados estão apresentados com a média $\pm$ erro padrão ($n=8$).

7. Discussão

As gonadotropinas hipofisárias, Fsh e Lh, atuam como reguladores endócrinos da função testicular, estimulando o desenvolvimento testicular através da produção de fatores de crescimento, esteróides sexuais, mudanças epigenéticas e outros (Heckert & Griswold, 1991 e 1993). Enquanto o Fsh atua principalmente nas fases iniciais da espermatogênese, o Lh tem seu papel nas fases finais (Heckert & Griswold, 1991 e 1993). Estudos recentes têm demonstrado que o Fsh promove a proliferação e diferenciação espermatogonial por aumentar nas células de Sertoli a produção de fatores de crescimento estimulatórios, como o Igf3 (Morais *et al.*, 2013; Nóbrega *et al.*, 2015). Além disso, o Fsh diminui a expressão do *amh* que é um membro da família TGF- β que inibe a diferenciação espermatogonial (Skaar *et al.*, 2011). Além disso, estudos recentes de RNAseq mostraram que o Fsh também regula uma série de genes da família TGF- β , como o *insl3*, *activina a*, *inha*, *lft1*, *bmp7b*, *nog2*, *gsdf* (Crespo *et al.*, 2016). Considerando-se a relevância do ramo da subfamília TGF- β (TGF- β , Inibina, Actina e Nodal) na estimulação pelo Fsh, decidimos estudar o papel desta via na espermatogênese do zebrafish utilizando-se um inibidor farmacológico específico, o A83-01 (Tojo *et al.*, 2005). Tojo e colaboradores (2005) sintetizaram e caracterizaram o A83-01 com o objetivo de bloquear o máximo de receptores da via TGF- β , em cultura de células epiteliais de mustelídeos e encontraram eficiência na inibição das Alks 4, 5 e 7 a concentração de 1 μ M; concentração 10 vezes menor que a necessária para o inibidor anterior (SB-431542) apresentar efeito semelhante (Tojo *et al.*, 2005).

Antes de verificar os efeitos do inibidor na espermatogênese do zebrafish, avaliamos primeiro os níveis de transcritos primários das diferentes *smads* nos testículos adultos de

zebrafish cultivados em condições basais e estimulados com Fsh. As análises de expressão mostraram que dentre as Smads testiculares, a *smad2* foi a forma mais expressa, à semelhança do que foi descrito para embriões de zebrafish (Dick *et al.*, 2000; Pogoda e Meyer *et al.*, 2002). Na presença de rzf Fsh (100 ng/mL) por 18h em cultivo, a *smad3b* foi a única *smad* que aumentou sua expressão em resposta ao Fsh. Este resultado indica que de forma direta ou indireta o Fsh estimula um dos mensageiros intracelulares da sinalização dos membros da subfamília TGF- β . Também sugere que esta via é de certa forma recrutada pela sinalização *downstream* do Fsh, corroborando os dados de RNAseq publicados anteriormente (Crespo *et al.*, 2016). O uso do inibidor farmacológico da sinalização da subfamília TGF- β em culturas de testículos de zebrafish na ausência ou presença de rzf Fsh por 18h ou 7 dias afeta de forma diferencial a expressão das *smads* testiculares. Os níveis de RNAm da *smad2* não sofrem alteração com o inibidor em nenhuma das condições. As *smad3a* e *smad3b* apresentaram maior variação ao longo dos grupos de forma bastante interessante. A inibição a curto prazo (18h) em condições basais inibiu a transcrição da *smad3b* significativamente e *smad3a*, porém esta última não significativamente. Nestas mesmas condições, a inibição a longo prazo (7 dias), promoveu um aumento da expressão destas duas *smads* (*smad3a* e *smad3b*) que tiveram sua expressão diminuída com 18h. De forma semelhante, no co-tratamento Fsh+A83-01, a *smad3a* teve sua transcrição diminuída a curto prazo (18h), porém significativamente elevada na inibição prolongada de 7 dias. Estes resultados sugerem que a curto prazo, o inibidor reprime a expressão das *smad3a* e *smad3b* (dependendo da condição), porém a longo prazo, apesar do bloqueio farmacológico e ausência do sinal intracelular, a célula produziu mais transcritos destas moléculas. Essa resposta celular pode ser um mecanismo compensatório para manter a homeostase da via da subfamília TGF- β . Neste trabalho, não foi avaliada a ausência de Smads fosforiladas, o que seria um indicio de que a via foi reprimida com o uso do inibidor farmacológico. No entanto, a concentração do inibidor suficiente para bloquear a

via foi baseada em trabalhos publicados anteriormente (Tojo *et al.*, 2005). Além disso, a diminuição da expressão das *smads* (*smad3a* e *smad3b*) a curto prazo suporta a eficiência do inibidor em reprimir a via.

Neste trabalho, também foi avaliado o efeito do inibidor sobre a expressão de alguns genes importantes na espermatogênese, como genes de espermatogônias tronco (*pou5f3*, *nanog*, *nanos3* e *gfra1a*), diferenciação espermatogonial (*dazl*) e fatores de crescimento (*amh*, *igf3* e *insl3*). A inibição prolongada da via da subfamília TGF- β em condições basais estimula a expressão de fatores de crescimento pró-diferenciação espermatogonial como *igf3* e *insl3*. O Igf3, como mencionado anteriormente, estimula a diferenciação espermatogonial em testículos de zebrafish (Nóbrega *et al.*, 2015). Enquanto que o Insl3 (insulin-like peptide 3) é produzido pelas células de Leydig e promove a diferenciação espermatogonial em zebrafish (Assis *et al.*, 2016). Como consequência deste ambiente em que a pró-diferenciação é favorecida, espera-se encontrar maior quantidade de espermatogônias diferenciadas. Não foram realizadas análises morfológicas deste material, mas a expressão aumentada do *dazl*, que é um gene expresso em espermatogônias do tipo Adiff e B (Nóbrega *et al.*, 2015), corrobora esta hipótese. Além disso, testículos de zebrafish cultivados com rzf Igf3 (100 ng/ml) demonstraram elevados níveis de *dazl* e maior frequência de espermatogônias diferenciadas (Nóbrega *et al.*, 2015). Considerando-se que o Fsh estimula a proliferação espermatogonial criando um ambiente de pró-diferenciação através do aumento de Igf3, Insl3 e andrógenos (Nóbrega *et al.*, 2015; Assis *et al.*, 2016; Crespo *et al.*, 2016), é de se supor que o co-tratamento do inibidor da subfamília TGF- β com o Fsh tenha um efeito aditivo e acentuado em se criar um ambiente de pró-diferenciação. Os resultados das expressões gênicas dos explantes testiculares cultivados por 7 dias na presença do inibidor e do Fsh corroboram esta hipótese. Com exceção do *insl3*, elevados níveis de *igf3* são observados nos testículos, além do aumento da expressão de *dazl*. Interessantemente, alguns genes de espermatogônias tronco, como *pou5f3* e *nanos3*, têm sua

expressão diminuída, o que sugere uma redução de células tronco em função da exacerbada diferenciação espermatogonial. As análises morfológicas e morfométrica dos testículos cultivados por 7 dias com o inibidor e o Fsh estão de acordo com dados da expressão gênica, mostrando aumento das espermatogônias diferenciadas e redução das espermatogônias indiferenciadas. Desta forma, pode-se concluir que a via de sinalização da subfamília TGF- β (TGF- β / Inibina/Activina/Nodal) em zebrafish apresenta papel na auto-renovação/proliferação das espermatogônias tronco. Esse achado está de acordo com trabalhos prévios que utilizaram o inibidor SB431542, bloqueador do mesmo ramo da subfamília TGF- β , em culturas de testículos em desenvolvimento fetal de camundongo (Souquet *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013). Nestes trabalhos, foi encontrado aumento da expressão de genes marcadores de meiose, que assim como o nosso trabalho, sugerem que a via da subfamília TGF- β tenha um papel na proliferação espermatogonial. De forma contrária, a inibição da subfamília BMP pelo uso da dorsomorfina ou por inibição da ALK6, mostrou aumento da proliferação de espermatogônias tronco em zebrafish (Neumman *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2013). Portanto, os dados aqui apresentados corroboram a hipótese do papel antagônico entre os dois ramos da via TGF- β .

Um resultado bastante interessante foi o aumento da expressão do gene *amh* nos testículos cultivados com Fsh + inibidor por 7 dias. Esta observação parece contraditória, pois estudos anteriores demonstraram que o Fsh diminui a expressão do *amh* (Skaar *et al.*, 2011; Morais *et al.*, 2017). Também imprevista, foi a relação encontrada entre a expressão gênica do *amh* e *igf3* nestas culturas, pois ambos os genes em trabalhos anteriores apresentaram relação de expressão gênica inversamente proporcional (Nóbrega *et al.*, 2015; Morais *et al.*, 2017). Como o inibidor na presença do Fsh cria um ambiente de diferenciação em excesso, o que leva a uma diminuição das espermatogônias tronco, sugere-se que o aumento da expressão do *amh* atua como forma de bloquear a diferenciação e estimular a proliferação de

espermatogônias tronco. Dando suporte a esta hipótese, temos a não variação da expressão gênica do *amh* nas culturas sem estímulo do rzf Fsh.

7. Conclusão

Nossos resultados mostram que a via da subfamília TGF- β (TGF- β , Inibina, Actina e Nodal) favorece de forma geral a uma condição de proliferação espermatogonial em testículos adultos de zebrafish. Ao utilizar um inibidor farmacológico desta via, A83-01, em conjunto com o Fsh, mostramos que este acentua os efeitos de pró-diferenciação do Fsh, estimulando de forma excessiva a diferenciação espermatogonial e reduzindo os estoques de espermatogônias tronco. Um resultado interessante foi o aumento da expressão do *amh* nestas condições, sugerindo que o aumento do Amh possa bloquear a diferenciação excessiva e ao mesmo tempo promover a proliferação das espermatogônias tronco. Em síntese, a subfamília TGF- β está associada em promover proliferação das espermatogônias tronco ou inibir a diferenciação espermatogonial.

Referências Bibliográficas

- ANDERSSON, E. et al. Pharmacological characterization, localisation and quantification of expression of gonadotropin receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ovaries. **Gen. Comp. Endocrinol**, v. 163, p. 329–339, 2010.
- ASSIS, L. H. C. et al. INSL3 stimulates spermatogonial differentiation in testis of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Cell and Tissue Research**, v. 363, n. 2, p. 579-588, 2016.
- CAMARGO, M. P. et al. Characterization of undifferentiated spermatogonia and the spermatogonial niche in the lambari fish *Astyanax altiparanae*. **Theriogenology**, v. 96, n. 1, p. 97-102, 2017.
- CHAUVIGNÉ, F. et al. Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Mediate the Androgenic Pathway in Leydig Cells of an Evolutionary Advanced Teleost. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 2, p. 1-11, 2012.
- CHIARINI-GARCIA, H. et al. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 111-122, 2014.
- CRESPO D, et al. Expression profiling identifies Setoli and Leydig cells genes as FSH targets in adult zebrafish testis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 437, p.237–251, 2016.
- DE ROOIJ, D. G.; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 776-798, 2000.
- DE ROOIJ, D. G. Rapid expansion of the spermatogonial stem cell box. **PNAS**, v. 103, n. 21, p. 7939-7940, 2006a.
- DE ROOIJ, D. G. Regulation of spermatogonial stem cell behaviour in vivo and in vitro. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 130-134, 2006b.
- DE ROOIJ, D. G. The spermatogonial stem cell niche. **Microscopic Research and Technique**, v. 72, n. 8, p. 580-585, 2009.
- DIJKE, P. T. et al. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 191, n. 1, p. 1-16, 2002.
- DICK, A., et al. Cloning and characterization of zebrafish smad2, smad3 Morpholino Oligonucleotides and smad4. **Gene**, v. 246, n. 69–80, 2000.
- FAN, Y. et al. TGF- β superfamily: how does it regulate testis development. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 4727-4741, 2011.

- GARCIA-LOPEZ, A. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. **Endocrinology**, v. 150, p. 357–365, 2009.
- GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSEL, L. D.; GRISWOLD, M. D. (eds.). **The Sertoli Cell**. Clearwater: Cache River Press, 1993, p. 704-739.
- HECKERT, L. L.; GRISWOLD, M. D. Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 5, p. 670-677, 1991.
- HECKERT, L. L.; GRISWOLD, M. D. Expression of the FSH receptor in the testis. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 48, p. 61-77, 1993.
- HESS, R. A.; FRANCA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 636, p. 1-15, 2009.
- ITMAN, C. et al. All in the family: TGF- β family action in testis development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 233-246, 2006.
- JOHNSTON, C. J. C. et al. TGF- β in tolerance, development and regulation of immunity. **Cellular Immunology**, v. 299, p. 14-22, 2016.
- JOSSO, N. et al. Testicular Anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. **Pediatric Endocrinology**, v.3; n.4, p.347-358, 2006.
- KITISIN, K. et al. Tgf-Beta signalling in development. **Science's STKE**, v. 399, p. cm1, 2007.
- LACERDA, S. M. S. N. et al. An overview of spermatogonial stem cell physiology, niche and transplantation in fish. **Animal Reproduction**, p. 798-808, 2012.
- LACERDA, S. M. et al. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 3-11, 2013.
- LAUX, D. W. et al. Dynamic analysis of BMP-responsive smad activity in live zebrafish embryos. **Developmental Dynamics**, v. 240, n. 3, p. 682-694, 2011.
- LIU, F. et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. **Nature**, v. 381, n. 6583, p. 620-623, 1996.
- LIN, X., et al. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. **Cell**, v.125, p. 915–928, 2006.
- Loveland, K. L & Robertson, D. M. The TGFb superfamily in Sertoli cell biology. **Sertoli Cell Biology**, p. 227-247, 2005.
- LOVELAND, K.L & HIME, G. R. TGF-beta superfamily members in spermatogenesis: setting the stage for fertility in the mouse and Drosophila. **Cell. Tissue Res.**, v. 322, p. 141–146, 2005.

MASSAGUÉ, J. et al. TGF β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. **Cell**, v. 103, n. 2, p. P295-309, 2000.

UNITED STATES PATENT. Massagué, J. et al. **Isolated P27 protein, nucleic acid molecules encoding same, methods of identifying agents acting on same, and uses of said agents**. US 6,635,450 B1, 21 out. 2003.

MASSAGUÉ, J.; XI, Q. TGF- β control of stem cell differentiation genes. **FEBS Letters**, v. 586, n. 14, p. 1953-1958, 2012.

MCLEAN, D. J. Spermatogonial Stem cell transplantation and testicular function. **Cell and Tissue Research**, v. 322, p. 21-31, 2005.

MILES, D. C. Signaling through the TGF β activin receptors ALK4/5/7 regulates testis formation and male germ cell development. **PLoS ONE**. V.8 p. 54606, 2013.

MIYAZAWA, K. Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling. **Genes to Cells**, v. 7, n. 12, p. 1191-1204, 2002.

MORAIS, R. D. V. S. et al. Antagonistic regulation of spermatogonial differentiation in zebrafish (*Danio rerio*) by Igf3 and Amh. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 454, p. 112-124, 2017.

MORAIS, R. D. V. S, et al. Thyroid hormone stimulates the proliferation of Sertoli cells and single type A spermatogonia in adult zebrafish (*Danio rerio*) testis. **Endocrinology**, v.154, p. 4365–4376, 2013

NEUMANN, J. C, et al. Mutation in the type IB bone morphogenetic protein receptor Alk6b impairs germ-cell differentiation and causes germ-cell tumors in zebrafish. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108 p. 13153–13158, 2011.

NÓBREGA, R. H. et al. An overview of function and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p. 197-206, 2009.

NÓBREGA, R. H. et al. Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, e12808, 2010.

NÓBREGA, R. H. et al. Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell. In: NÓBREGA, R. H. (ed.). **Spermatogonial Stem Cells and their Endocrine and Paracrine Regulation in Zebrafish**. Zutphen: Wöhrmann Print Service, 2014, p. 73-120.

NÓBREGA, R. H. et al. Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3. **Endocrinology**, v. 156, n. 10, p. 3804-3817, 2015.

NEF, S.; PARADA, L. F. Cryptorchidism in mice mutant for INSL3. **Nat Genet**, v. 22, p. 295–299, 1999.

OATLEY, J. M. et al. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 515-521, 1999.

- OATLEY, J. M.; BRINSTER, R. L. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 24, p. 263-286, 2008.
- OHTA, T. et al. Follicle-Stimulating Hormone Induces Spermatogenesis Mediated by Androgen Production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 6, p. 970-977, 2007.
- POGODA, H. M.; MEYER, D. Zebrafish Smad7 is regulated by Smad3 and BMP signals. **Developmental Dynamics**, v. 224, n. 3, p. 334-33, 2002.
- SCHIER, A. F.; SHEN, M. M. Nodal signalling in vertebrate development. **Nature**, v. 403, p. 385-389, 2000.
- SCHULZ, R. W. et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390-411, 2010.
- SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H. Regulation of Spermatogenesis. **Encyclopedia of Fish Physiology**, v. 1, p. 627-634, 2011.
- SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF- β Signalling from Cell Membrane to the Nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685-700, 2003.
- SKAAR K.S. et al. Proteolytically activated, recombinant anti-mullerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. **Endocrinology**, v. 152, p. 3527-3540, 2011.
- SKINNER, M. K. et al. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. **The Journal of Cell Biology**, v. 100, p. 1941-1947, 1985.
- SAVAGE, C. et al. Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. **PNAS**, v. 93, n. 2, p. 790-794, 1996.
- SAVITT, J. et al. The *In Vivo* Response of Stem and Other Undifferentiated Spermatogonia to the Reversible Inhibition of GDNF Signaling in the Adult. **Stem Cells**, v. 30, n. 4, p. 732-740, 2012.
- SOUQUET, B. et al. Nodal signalling regulates the entry into meiosis in fetal germ cells. **Endocrinology**, v. 153, p. 2466–2473, 2012.
- SPILLER, C. et al. Regulation of fetal male germ cell development by members of the TGF β superfamily. **Stem Cell Research**, v. 24, p. 174-180, 2017.
- SPINNLER, K. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. **Human reproduction**, v. 25, n. 9, p. 2181-2187, 2010.

- TOJO, M. et al. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. **Cancer Science**, v. 96, n. 11, p. 791-800, 2005.
- VOGT, J. et al. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF β and BMP pathways. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 11, p. 1831-1842, 2011.
- WONG, T.; COLLODI, P. Dorsomorphin Promotes Survival and Germline Competence of Zebrafish Spermatogonial Stem Cells in Culture. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71332, 2013.
- WU, Q. et al. Nodal/activin signaling promotes male germ cell fate and suppresses female programming in somatic cells. **Development**, v. 140, n. 2, p. 291-300, 2013.
- XU, L. et al. Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 42569-42577, 2003.
- YOMOGIDA, K. et al. Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, 1303-1037, 2003.
- ZHAO, G. Q.; GARBERS, D. L. Male germ cell specification and differentiation. **Developmental Cell**, v. 2, p. 537-547, 2002.