

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Nicho espermatogonial em *Cyprinus carpio* e
papel do Amh na espermatogênese**

Marcos Antonio de Oliveira
Zootecnista

Jaboticabal, São Paulo
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Nicho espermatogonial em *Cyprinus carpio* e
papel do Amh na espermatogênese**

Mestrando: Marcos Antonio de Oliveira

Orientador: Dr. Rafael Henrique Nóbrega

Co-orientador: Dr. Emanuel R. M. Martinez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Jaboticabal, São Paulo
2014**

O48n Oliveira, Marcos Antonio de
Nicho espermatogonial em *Cyprinus carpio* e o papel do Amh na espermatogênese / Marcos Antonio de Oliveira. – – Jaboticabal, 2014
iii, 84 p.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2014

Orientador: Rafael Henrique Nóbrega

Banca examinadora: Breno Henrique Caneguim, Maria Inês Borella

Bibliografia

1. Ciclo reprodutivo. 2. Carpa comum. 3. Células de Sertoli tronco. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.03

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

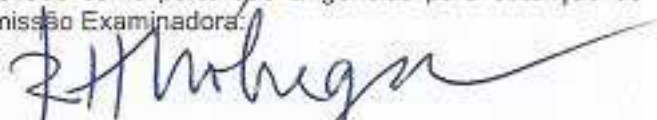
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Nicho espermatogonial em *Cyprinus carpio* e papel do Amh na espermatogênese

AUTOR: MARCOS ANTÔNIO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NOBREGA

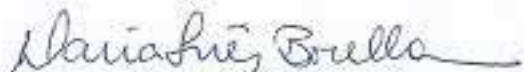
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RAFAEL HENRIQUE NOBREGA
Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu



Prof. Dr. BRENO HENRIQUE CANEGUM
Depto Morfologia, Instituto de Ciências da Saúde da Faculdade Paulista de UNIP, Araraquara-SP



Profa. Dra. MARIA INÉS BORELLA
Departamento de Histologia e Embriologia / Universidade de São Paulo

Data da realização: 01 de agosto de 2014.

Sumário

Resumo	5
Abstract	5
CAPÍTULO 1	7
OBJETIVOS	22
CAPÍTULO 2	24
Conclusão Geral	74

Agradecimentos

À Universidade Estadual de São Paulo, ao Instituto de Biociências e ao Centro de Aquicultura da UNESP pela oportunidade oferecida;

A todos docentes do Centro de Aquicultura – CAUNESP, pelos ensinamentos passados;

Ao Prof. Dr. Cláudio de Oliveira e Prof. Dr. Cesar Martins, pelo espaço fornecido e uso de equipamentos;

A Profa. Dr. Adriana Fernandes de Barros, por seus ensinamentos e amizade;

Aos secretários David, Veralice e Luciana, por toda a atenção dispensada;

Aos amigos e companheiros, que juntos formamos um grupo de muita dedicação e trabalho: Arno, Juliana, Andres, Lucas, Gabi, Sheryll, Aldo, Gustavo (mano), Paulo, Jefferson (poncho); Fabricio; Núria Ester;

Ao meu co-orientador e amigo Dr. Emanuel Martinez pela confiança, paciência, amizade e pelos conhecimentos passados;

Aos funcionários Valdecir (CAUNESP), Zé e Ricardo (IBB) por toda a ajuda;

E principalmente ao,

Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega, pela orientação e principalmente por sua confiança na realização deste projeto, e na conquista deste sonho, agradeço também pela oportunidade, atenção e amizade.

São poucas palavras, mas sinceras, onde quero lhe dizer:

“Muito obrigado por fazer do aprendizado não um trabalho, mas um contentamento. Por fazer com que me sentisse uma pessoa de valor. Por me ajudar a descobrir o que fazer de melhor e, assim, fazê-lo cada vez melhor. Obrigado por afastar o medo das coisas que pude não compreender, levando-me, por fim, a compreendê-las... Obrigado por me convencer de que sou melhor do que suspeitava.”

A todos, o meu muito obrigado!

Dedicatória

Aos meus pais Juarez e Luzia;

Meus irmãos Márcio, Márcia e Zélia;

Meus sobrinhos Arthur e Davi

Meus tios e

*Minhas avós Madalenas e Sabina “in memoriam” por todo, amor,
carinho, dedicação para comigo!*

“Você não escolhe sua família. Eles são um presente de Deus para você, assim como você é para eles.”

Com muito carinho, dedico.

*À minha amada namorada Angela Emi Takamura, que sempre me
apoiou, deu forças e acima de tudo foi minha companheira, nos
momentos de alegria e tristeza...*

Mostrou-me Carinho e Paciência em cada instante

Com todo amor, carinho e sinceridade

Ofereço!

Apoio financeiro

A Capes, pela bolsa de Mestrado concedida;

A FUNDUNESP (Proc. 0196/005/14-PROPG/CDC);

Ao CNPq (Proc. 482946/2012-1; 3-2012/150068);

A FAPESP (Proc. 2012/00423-6).

Resumo

Neste estudo, caracterizamos o nicho espermatogonial em carpa avaliando a expressão do *amh* em testículos com alta ou baixa expressão. Para tanto, vinte carpas comum adultas receberam pulsos de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina), durante 3 dias consecutivos (2 injeções intraperitoneal/dia), e os testículo foram amostrados 4 horas, 1, 2 e 3 semanas após o último pulso. As espermatogônias do tipo A indiferenciada foram as únicas células germinativas capazes de reter BrdU após 3 semanas. Curiosamente, o BrdU diluiu mais rapidamente entre as espermatogônias tronco "ativa" enquanto que nas espermatogônias tronco "reserva", manteve-se estável. As espermatogônias tronco "reserva" foram localizados próximos do interstício, enquanto as espermatogônias tronco "ativa" foram encontrados na região intertubular. Algumas células de Sertoli foram BrdU-positivas depois de 3 semanas de pulso. Entre as células de Sertoli BrdU-positivas, ~ 30-40% estão "livres", enquanto que ~ 60-70% estão associadas com células germinativas. Isto sugere a existência de células de Sertoli tronco, que estão localizados no nicho espermatogonial. O gene *amh* foi clonado e caracterizado em carpa comum e sua expressão ocorre nas células de Sertoli que envolvem espermatogônias indiferenciadas. Os hormônios folículo-estimulante e estrógeno diminuem a expressão do *amh*. Em animais que possuem alta expressão de *amh*, possuem pouca atividade proliferativa, já com elevada proliferação, os níveis de *amh* diminuem significativamente. Desta forma, sugere-se que a diminuição do *amh*, cria uma condição permissiva para proliferação e diferenciação das espermatogônias em carpa. Tais resultados servirão de base para aplicar este conhecimento para mediar a puberdade precoce em espécies nativas/exóticas de importância econômica na aquicultura.

Palavras-chave: nicho espermatogonial, Amh, células de Sertoli tronco, carpa comum

Abstract

In this study, we start characterizing the spermatogonial niche in carp by evaluating *amh* expression in testes with high or low proliferative activity. 20 adult carp received pulses of BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine), during 3 consecutive days (2 intraperitoneal injections/day), and testis was sample dafter 4 hours, and 1, 2 and 3 weeks after the last pulse. Type Aund were the only germ cells able to retain BrdU after a long period of chase (3 weeks). Interestingly, BrdU disappeared more quickly from "active" stem cell while in "reserve" stem cell, it remained stable. The "reserve" stem cell label-retaining cells were located near the interstitium, while "active" stem cell were found in the intertubular area. Some Sertoli cells were BrdU-positive after 3 weeks of pulse. Among the slow-dividing, BrdU-positive Sertoli cells, ~30-40% are "free", and ~60-70% associated with germ cells. This suggests the existence of Sertoli stem cells which are located in the

spermatogonial niche. The *amh* gene was cloned and characterized in common carp, and the *amh* is expressed in Sertoli cells involving undifferentiated spermatogonia. The follicle stimulating hormone and estrogen decrease *amh* expression. It was also shown that animals with high expression of *amh*, have low proliferative activity. When the testes with high proliferation, *amh* levels decrease significantly. Thus, it is suggested that counts down the *amh* creates a permissive condition for proliferation and differentiation of spermatogonial in carp. These results provide a basis for applying this knowledge to mediate early puberty in exotic/native species economically important in aquaculture.

Keywords: spermatogonial stem cell niche, Amh, Sertoli stem cell, common carp

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Capítulo 1

Considerações gerais

Dentre os vertebrados, os peixes constituem o grupo mais numeroso e com maior diversidade de espécies (NELSON, 2006). A reprodução sexuada é o modo típico de reprodução dos peixes, que envolve a produção de gametas femininos e masculinos. Nos machos, os testículos produzem grande número de pequenos gametas, os espermatozoides, enquanto que nas fêmeas, os ovários produzem poucos, mas grandes gametas, ricos em reservas, os oócitos (SCHULZ e NÓBREGA, 2011a).

Nos peixes, assim como nos demais vertebrados, o testículo, órgão reprodutor masculino, responsável pela espermatogênese, é composto por dois compartimentos principais: o intersticial e o germinativo, conforme ilustra a Figura 1 (SCHULZ *et al.*, 2010). Neste último, estão presentes as células germinativas e células de Sertoli, que formam a unidade morfofuncional da espermatogênese.

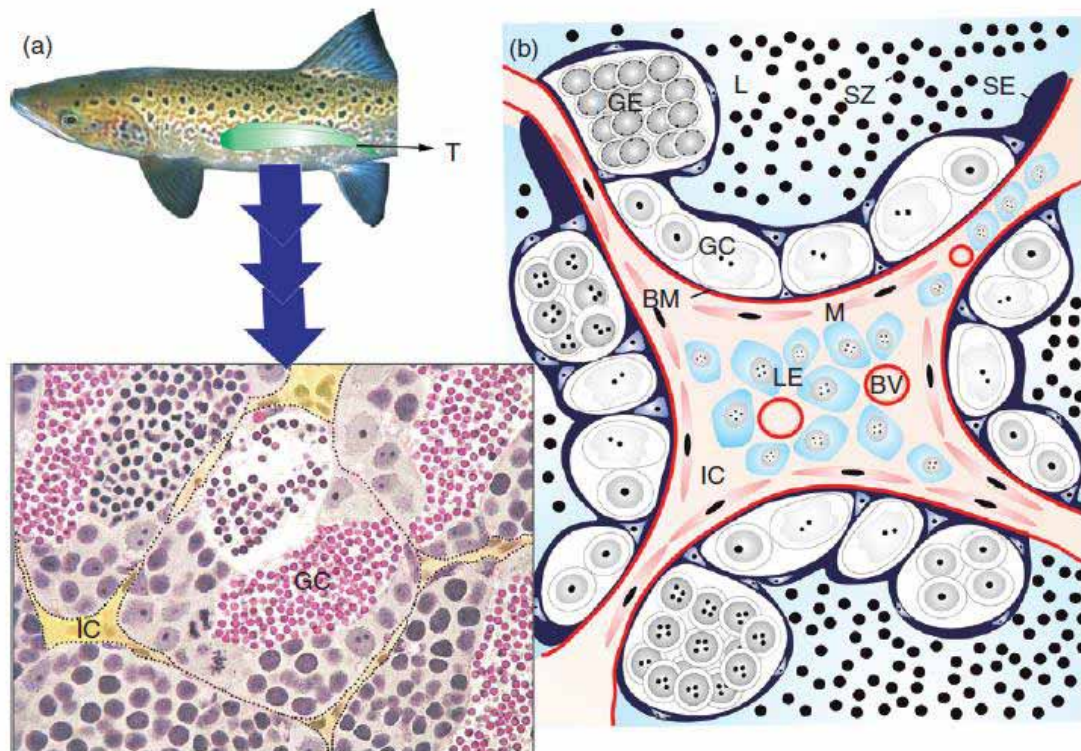


Figura 1 (a) Compartimentos existentes nos testículos (T) dos vertebrados; o compartimento intersticial (IC) e o germinativo (GC). A área em amarelo corresponde à área do compartimento intersticial. **Figura 1(b)** esquema de uma seção transversal do testículo, onde é possível observar o epitélio germinativo (GE), as

células de Sertoli (SE) e as células germinativas (GC) formando cistos. No lúmen (L) do testículo estão os espermatozoides (SZ). No compartimento intersticial (IC), estão as células peritubulares mióides (M), células de Leydig (LE) e vasos sanguíneos (BV). A membrana basal (BM) separa o compartimento germinativo do intersticial. Retirado de Schulz e Nóbrega (2011a).

Nos peixes teleósteos, a espermatogênese ocorre no interior de estruturas denominadas espermatócistos, ou cistos, que se formam quando uma única espermatogônia primária ou do tipo A é completamente envolvida pelos prolongamentos das células de Sertoli (Figura 1) (GRIER, 1993; PUDNEY, 1993; 1995; SCHULZ *et al.*, 2010). As células germinativas derivadas destas espermatogônias dividem-se sincronicamente para constituir um clone de células germinativas que é envolvido por um número variado de células de Sertoli, dependendo do tipo de cisto (VILELA *et al.*, 2003). Diferentemente dos mamíferos, onde células de Sertoli estão em contato com várias gerações de células germinativas (RUSSELL *et al.*, 1990), na espermatogênese cística as células de Sertoli normalmente estão em contato com apenas um tipo específico de célula germinativa durante a evolução do processo espermatogênico (Figura 1) (NÓBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). Estes cistos encontram-se apoiados na túnica própria dos túbulos seminíferos, que é formada por uma camada acelular, denominada de membrana basal e também pelas células peritubulares mióides (Figura 1) (KOULISH *et al.*, 2002).

Um aspecto peculiar da espermatogênese dos peixes é a proliferação das células de Sertoli nos indivíduos adultos, evento este restrito à vida fetal/neonatal dos mamíferos (SCHULZ *et al.*, 2010). A proliferação das células de Sertoli ocorre principalmente associada a cistos de espermatogônias, onde as células de Sertoli se proliferam no intuito de suportar o crescimento e desenvolvimento das células germinativas (SCHULZ e NÓBREGA, 2011b). Portanto, a proliferação das células de Sertoli é considerada como o fator primário responsável pelo aumento da produção espermática a cada ciclo reprodutivo dos peixes teleósteos (SCHULZ *et al.*, 2005; NÓBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010).

Recentemente, uma nova terminologia espermatogonial foi proposta para os peixes teleósteos (LEAL *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010), com base no número de células por cisto, e nos critérios tradicionalmente empregados para roedores tais como morfologia nuclear, número e disposição de nucléolos, tipo e padrão de distribuição de cromatina. Assim, conforme ilustra a Figura 2, as espermatogônias de zebrafish foram classificadas em: Aund* (isolada) → Aund (isolada) → Adiff (2-

8 células por cisto) → B early (16-32 células por cisto) → B late (64-256 células por cisto), com 9 gerações espermatogônias ao todo (LEAL *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). No entanto, merece ser mencionado que existem consideráveis diferenças em relação ao número de gerações de espermatogônias diferenciadas (Adiff e B) de espécie para espécie (MIURA, 2002; SCHULZ e MIURA, 2002; SCHULZ *et al.*, 2010; SCHULZ e NÓBREGA, 2011a). Em relação às espermatogônias indiferenciadas, dois tipos isolados foram encontrados nos testículos de zebrafish: o tipo A indiferenciado* (Aund*) de núcleo irregular, cromatina finamente granular, e grande quantidade de “nuages” (ver abaixo), e o tipo A indiferenciado (Aund) com núcleo arredondado, cromatina condensada e poucas “nuages” (Figura 2) (LEAL *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010; NÓBREGA *et al.*, 2010). Até o presente momento, não se sabe se as Aund* e Aund estão separadas por divisão mitótica ou se constituem o mesmo tipo celular em diferentes etapas do ciclo celular (LEAL *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010).

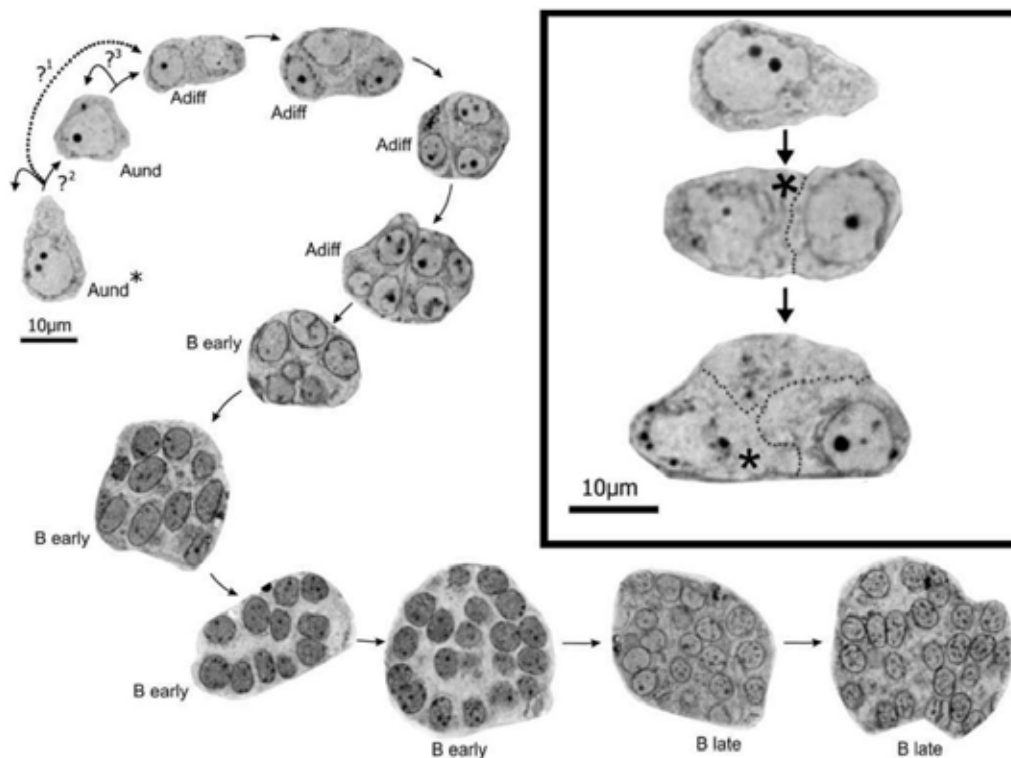


Figura 2. Gerações espermatogoniais em *Danio rerio*. Espermatogônia A do tipo indiferenciado* (Aund*), espermatogônia A do tipo indiferenciado (Aund), espermatogônia A do tipo diferenciado (Adiff) com 4 gerações, espermatogônia B inicial (B early) com 4 gerações, e espermatogônia B final (B late) com 2 gerações. ?1 questiona a existência de divisão assimétrica da Aund*, conforme é também observado no inseto em maior aumento (ver asteriscos); ?2 para indicar incerteza se Aund* e Aund estão separadas por ciclo celular; e ?3 para o potencial tronco da Aund*. Retirado de Schulz *et al.* (2010).

Dentre as espermatogônias indiferenciadas (Aund e Aund*) encontram-se as espermatogônias tronco. As espermatogônias tronco localizam-se em um microambiente no testículo, chamado nicho espermatogonial, que é uma região especializada, responsável pela sobrevivência das espermatogônias tronco, regulando sua auto – renovação, quiescência e diferenciação (DE ROOIJ e RUSSEL, 2000; NÓBREGA *et al.* 2009; SCHULZ *et al.* 2010; OATLEY e BRINSTER, 2012).

Apesar de desempenhar um importante papel no destino das espermatogônias troncos, a composição molecular e celular do nicho espermatogonial para a maioria dos vertebrados, incluindo os peixes encontra-se incipiente. Em algumas espécies de peixes como o *Danio rerio* (NÓBREGA *et al.*, 2010) e mamíferos como o *Tayassu tajacu* (CAMPOS-JUNIOR *et al.*, 2012) os nichos foram identificados entre regiões dos túbulos seminíferos, que estão adjacentes ao compartimento intersticial. A Figura 3 ilustra os componentes do nicho espermatogonial e seu papel no destino das espermatogônias tronco.

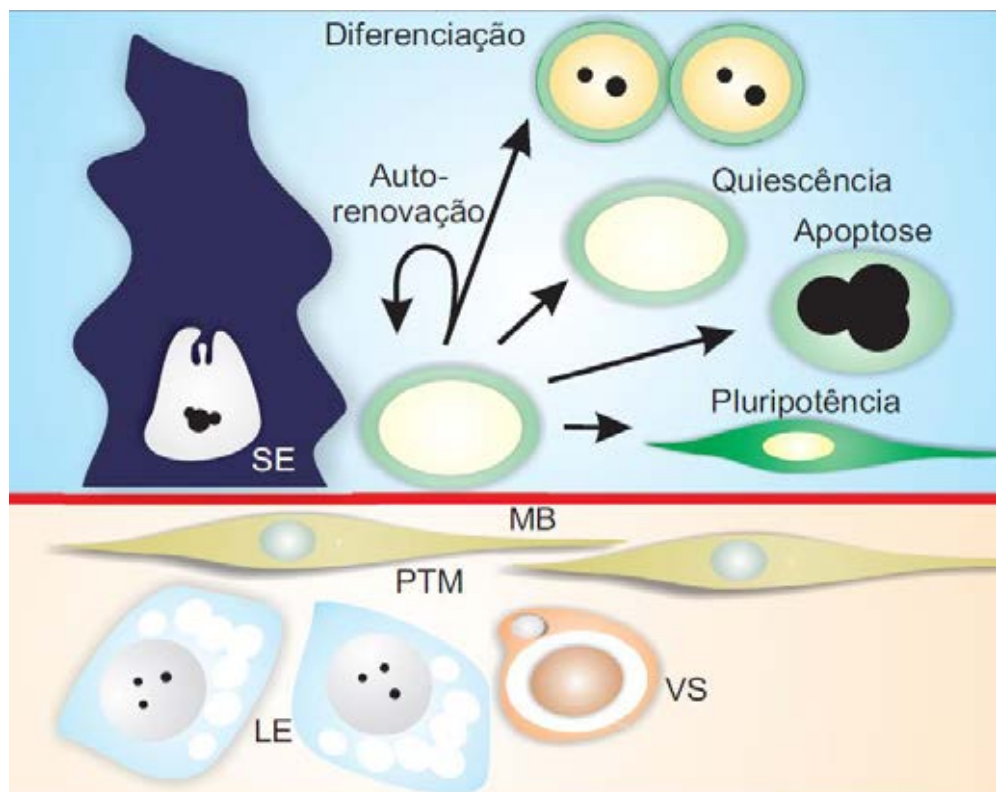


Figura 3. Representação esquemática do nicho das espermatogônias tronco em roedores. Apesar de a membrana basal ser uniforme ao longo da circunferência dos túbulos seminíferos, as espermatogônias tronco concentram-se preferencialmente nas áreas próximas do interstício, em especial de células de Leydig e vasos sanguíneos. O nicho das espermatogônias tronco, portanto, é definido pelas células de Sertoli (SE), membrana

basal (MB), células peritubulares mióides (PTM) subjacentes e pelos elementos intersticiais, como células de Leydig (LE) e vasos sanguíneos (VS). Através de sua composição celular e molecular, o nicho regula as propriedades das espermatogônias tronco como ilustrado. Nóbrega (desenho pessoal).

É através dos fatores produzidos no nicho que as espermatogônias tronco se auto - renovam ou se diferenciam, processos estes altamente balanceados que garantem a base e a continuidade da espermatogênese durante a vida reprodutiva dos machos (ALVARENGA e FRANÇA, 2009; NÓBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010). Quando um dos processos demonstrados na Figura 4 é predominante sobre o outro, a espermatogênese é interrompida seja pela formação de um câncer testicular devido à contínua divisão mitótica das espermatogônias tronco, ou na situação oposta, pelo esgotamento da espermatogênese em função da não reposição das espermatogônias tronco (DE ROOIJ, 2006a,b). O balanço entre a auto - renovação e diferenciação devem ser, portanto, estritamente regulado nestas regiões (DE ROOIJ e RUSSELL, 2000; NÓBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010).

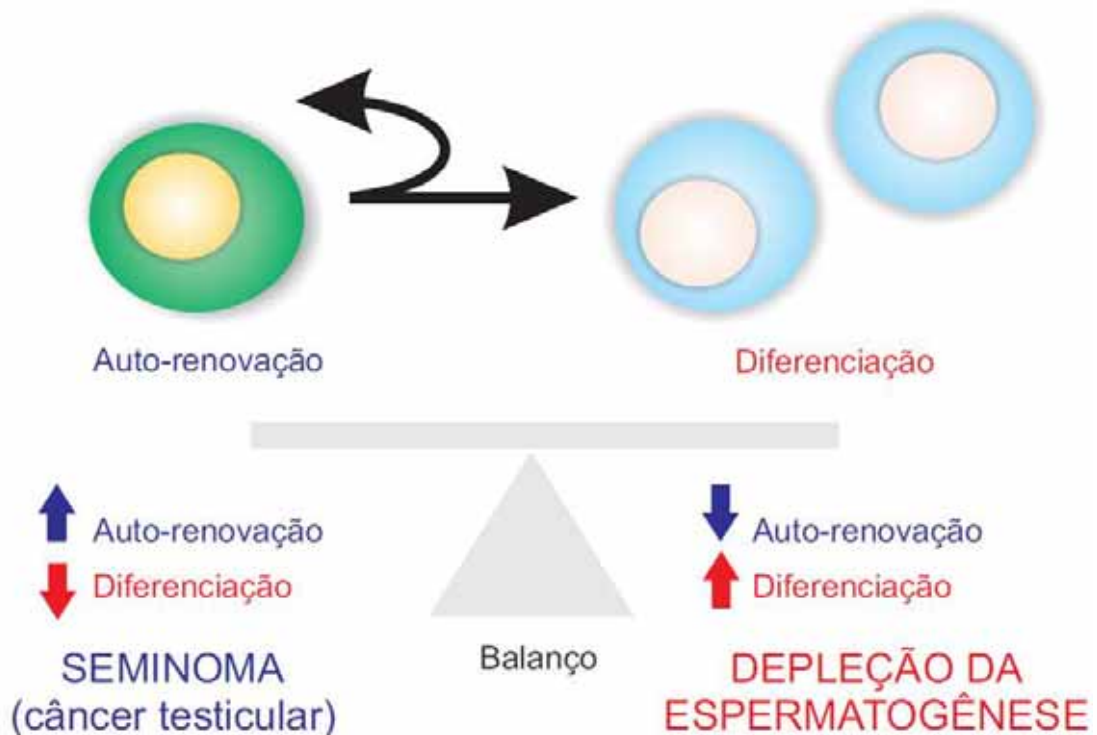


Figura 4. Balanço entre auto - renovação e diferenciação das espermatogônias tronco. Situações extremas que modificam o balanço no sentido da auto - renovação ou da diferenciação interrompem a espermatogênese devido à formação de um seminoma (câncer testicular), ou pela depleção da espermatogênese, respectivamente.

Este balanço depende de um controle endócrino regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada, conforme ilustra a Figura 5, em que o processo de espermatogênese nos teleósteos é regulado principalmente por dois hormônios gonadotróficos produzidos pela hipófise: o hormônio folículo estimulante (Fsh) e o hormônio luteinizante (Lh) (SCHULZ e NÓBREGA, 2011b). Em mamíferos, o LH atua na esteroidogênese das células de Leydig, enquanto que o FSH regula as funções das células de Sertoli. Estudos recentes têm demonstrado que em peixes teleósteos, o Fsh também tem um papel na função das células de Leydig, sendo um potente indutor na liberação de andrógenos (ver revisão em SCHULZ *et al.*, 2010). Isto se deve à presença de seus receptores de Fsh nas células de Leydig, conforme demonstrado em *Anguilla japonica* (OTHA *et al.*, 2007); *Clarias gariepinus* (GARCIA-LOPEZ *et al.*, 2009); *Danio rerio* (GARCIA-LOPEZ *et al.*, 2010). Assim, além da clássica regulação pelo Lh, a esteroidogênese dos peixes teleósteos também é regulada pelo Fsh (SCHULZ *et al.*, 2010). Somado a isto, estudos evolutivos mostram que o Fsh apresenta-se conservado entre peixes e mamíferos, o que não ocorre para o Lh, que tem padrão de expressão e regulação totalmente diferentes entre peixes e mamíferos (KANDA *et al.*, 2011). Desta forma, as regras gerais estabelecidas a partir de espécies de mamíferos para a regulação da espermatogênese pelas gonadotrofinas podem não ser relevantes e aplicadas aos peixes (SAMBRONI *et al.*, 2013).

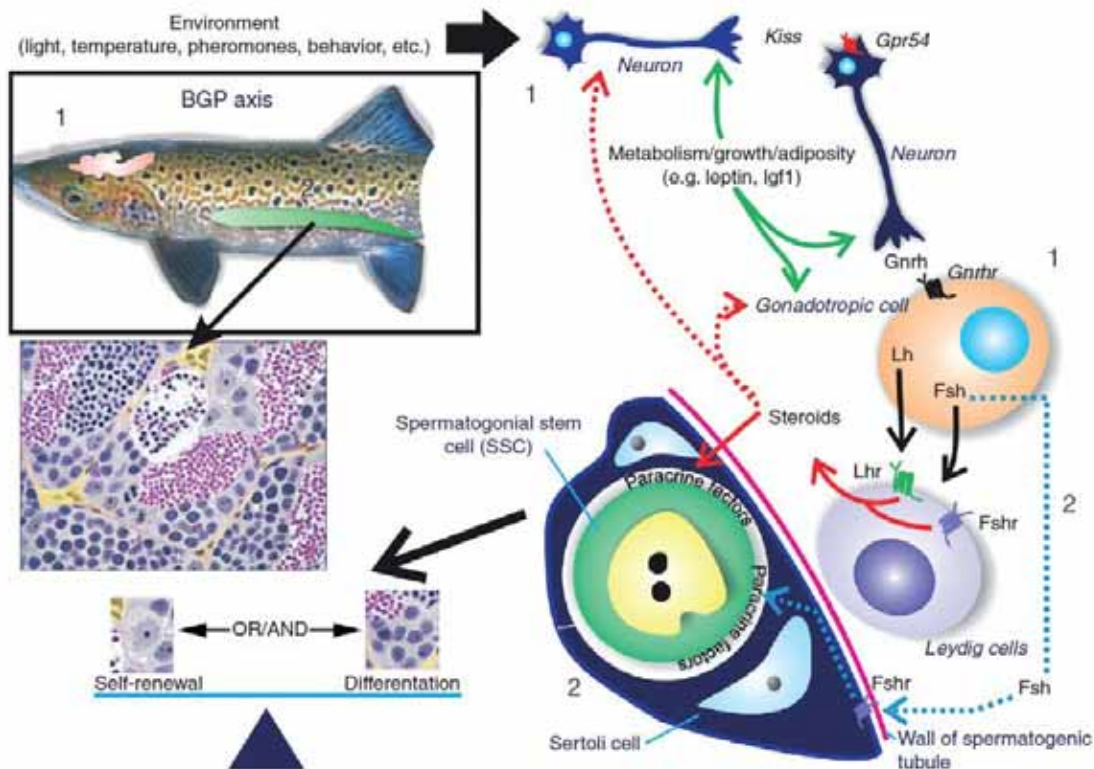


Figura 5. Regulação endócrina da espermatogênese de peixes teleósteos. 1: Estímulos externos (fotoperíodo, temperatura, feromônios, comportamento e outros) estimulam neurônios produtores de Kisspetina (Kiss) no hipotálamo. Através de seus receptores (Gpr54), a Kiss induz a produção de GnRh (hormônio liberador de gonadotropina), que por sua vez atua sobre células hipofisárias estimulando a produção e liberação de Fsh e Lh. O Fsh e Lh caem na corrente sanguínea atuando em suas células alvo no testículo. Tanto o Fsh como o Lh estimulam a produção e liberação de esteróides, os quais têm efeito de feedback negativo (linha tracejada) no hipotálamo e hipófise. O Fsh regula o destino das espermatogônias tronco (auto - renovação e/ou diferenciação) através da produção de fatores parácrinos pelas células de Sertoli. 1 indica sistema nervoso (hipotálamo-hipófise), e 2 testículo, a figura também mostra a influência de fatores internos (por exemplo metabolismo, crescimento, adiposidade e outros) sob os neurônios produtores de Kiss e GnRh. Retirado de Schulz e Nóbrega (2011b).

Campbell e seus colaboradores (2003) demonstraram em *Oncorhynchus tshawytscha* que os elevados níveis plasmáticos de Fsh e andrógenos coincidem com o período de maior atividade espermatogonial. É bem provável que o Fsh estimule a diferenciação e proliferação espermatogonial através de fatores presentes no nicho espermatogonial, produzidos e secretados pelas células de Sertoli (SCHULZ *et al.*, 2010). Entretanto, o papel do Fsh na espermatogênese dos peixes teleósteos, permanece ainda desconhecido. Até o momento, descobriu-se que o Fsh regula a liberação de poucos fatores de crescimento produzidos pelas células de Sertoli, os quais interferem na atividade proliferativa das células germinativas. Dentre eles, o hormônio Anti-Mülleriano (Amh) (MIURA *et al.* 2002; SKAAR e NÓBREGA *et al.*, 2011; SAMBRONI *et al.*, 2013). O Amh é um membro da família TGF β , com importante papel na regressão do ducto de

Müller durante a diferenciação sexual masculina de tetrápodes e também está envolvido na esteroidogênese e desenvolvimento folicular (JOSSO *et al.*, 2006). Durante o período de diferenciação gonadal dos teleósteos, o Amh é expresso precocemente nas gônadas masculinas. Pala e colaboradores (2008) também demonstraram a expressão do *amh* durante o desenvolvimento de machos de *Squalius alburnoides*, sugerindo que em analogia com outros teleósteos, o Amh poderia desempenhar um papel importante no desenvolvimento inicial das gônadas dos machos.

Na forma adulta, o *amh* é expresso de forma diferencial entre os sexos; sendo mais expresso nos machos do que nas fêmeas. No entanto, pouco se sabe sobre o papel do Amh na espermatogênese e função testicular de machos adultos. Em zebrafish, *Danio rerio*, o Amh inibe a diferenciação espermatogonial mantendo as espermatogônias tronco em seu estado indiferenciado e também apresenta um efeito inibitório nas células de Leydig sob a liberação de andrógenos induzida por Fsh (Figura 6) (SKAAR e NÓBREGA *et al.*, 2011).

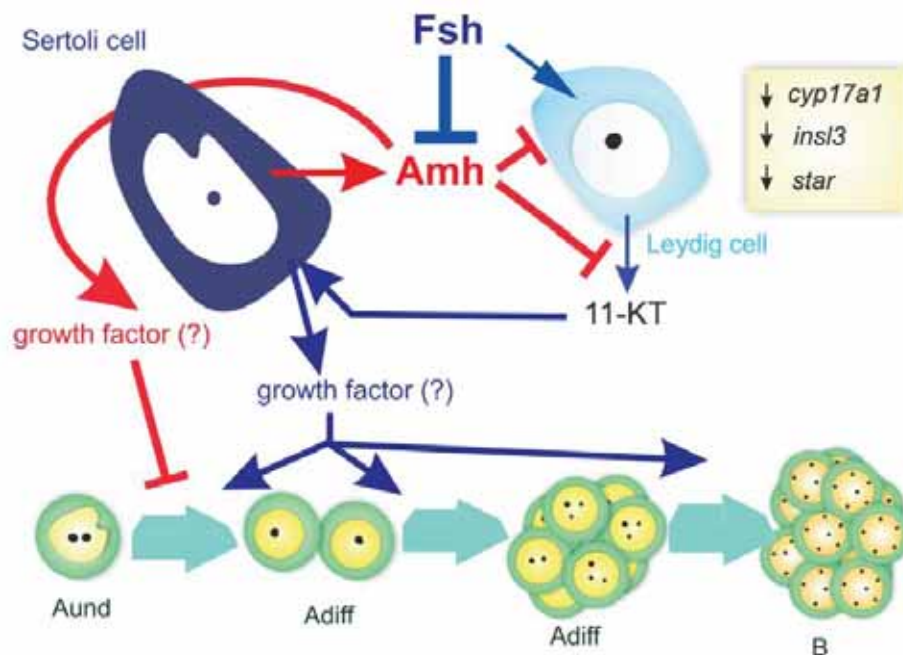


Figura 6. Papel do Amh na espermatogênese de zebrafish. As células de Sertoli produzem Amh que através de uma via autócrina estimula a produção de fatores de crescimento pelas células de Sertoli. Estes fatores de crescimento atuam no nicho espermatogonial, bloqueando a diferenciação e a proliferação das espermatogônias tronco. O Amh também inibe a função das células de Leydig em produzir e liberar andrógenos. Como principal regulador do nicho espermatogonial, o Fsh diminui a expressão do Amh criando uma condição permissiva para a diferenciação e proliferação espermatogonial. O Fsh estimula a produção de andrógenos (11-Ketotestosterona) pelas células de Leydig, que induz a produção de fatores de crescimento pró-diferenciação pelas células de Sertoli. O quadro a direita ilustra os genes que têm sua expressão diminuída na presença do Amh. As gerações espermatogônias também estão mostradas na figura; espermatogônia indiferenciada (Aund), espermatogônia diferenciada (Adiff), e espermatogônia do tipo B (B). Retirado de Skaar e Nóbrega *et al.* (2011).

Além disso, o Fsh diminui significativamente a expressão do *amh* em 24h de cultura (Figura 6). Neste sentido, o Fsh parece ser um elemento chave na regulação do nicho espermatogonial. Ao diminuir a expressão do *amh*, o Fsh cria um ambiente permissivo à diferenciação espermatogonial, que é mantida pelo aumento da expressão de outros fatores de crescimento como o *Igf3* (encontrado nas gônadas dos teleósteos, com função ainda pouco estudada (WANG *et al.* 2008; NÓBREGA *et al.*, 2013 em preparação).

No entanto, ainda é desconhecido como estes fatores de crescimento interagem entre si. Do mesmo modo, os mecanismos e os componentes envolvidos na regulação da expressão do gene *amh* no nicho espermatogonial permanecem desconhecidos.

Justificativa

Em zebrafish, *Danio rerio*, um dos fatores de crescimento que atuam no nicho espermatogonial é o hormônio anti-Mülleriano (SKAAR e NÓBREGA *et al.*, 2011). Recentemente, estudos realizados em nosso grupo de pesquisa, identificaram e sequenciaram o gene *amh* em carpa comum, *Cyprinus carpio* (projeto FAPESP 2012/00423-6). No entanto, seu sítio de localização, assim como sua expressão e atividade na espermatogênese permanecem ainda desconhecidos. Desta forma, torna-se importante compreender os aspectos básicos do Amh em carpa, no intuito de entender a regulação endócrina e parácrina da espermatogênese. A regulação endócrina e molecular do nicho espermatogonial torna-se importante para compreender os aspectos básicos da biologia espermatogonial. A escolha da carpa deve a proximidade filogenética com o *Danio rerio*, além de seu alto valor de mercado, e também pelo fato de ter sido a segunda espécie mais produzida no Brasil (94.579 toneladas) (FAO, 2013).

No contexto fundamental, esta pesquisa estará gerando novos conhecimentos dentro da fisiologia endócrina de peixes teleósteos, em especial na regulação endócrina e parácrina do nicho espermatogonial para compreender a homeostase da espermatogênese desses animais, tornando-se assim, um potente conhecimento para ser aplicado em questões de aquicultura e biotecnologia.

Referências

- ALVARENGA, E. R.; FRANÇA, L. R. Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Biology of Reproduction**, vol.80, p.537-544. 2009.
- CAMPOS-JUNIOR, P. H.; COSTA, G. M.; LACERDA, S. M.; REZENDE-NETO, J. V.; PAULA, A. M.; HOFMANN, M. C.; FRANÇA, L. R. The spermatogonial stem cell niche in the Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). **Biology of Reproduction**, vol.86, n.155, p.1-10. 2012.
- CAMPBELL, B.; DICKEY, J. T.; SWANSON, P.; Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. **Biology of Reproduction**, vol.69, n.6, p.2109-2117. 2003.
- GARCIA-LOPEZ, A.; BOGERD, J.; GRANNEMAN, J. C.; VAN DIJK, W.; TRANT, J. M.; TARANGER, G. L.; SHULZ, R. W. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. **Endocrinology**, vol.150, n.1, p.357-365. 2009.
- GARCIA-LOPEZ, A.; DE JONGE, H.; NÓBREGA, R. H.; DE WALL, P. P.; VAN DIJK, W.; HEMRIKA, H.; TARANGER, G. L.; BOGERD, J.; SHULZ, R. W. Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins. **Endocrinology**, vol.151, n.5, p.2349-2360. 2010.
- GRIER, H. J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSELL, L. D. e GRISWOLD, M. D. editors. **The Sertoli cell**. Clearwater, F. L: Cache River Press, p.704-739, 1993.

- JOSSO, N.; PICARD, J. Y.; REY, R.; DI CLEMENTE, N. Testicular Anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. **Pediatric endocrinology**, vol.3; n.4, p.347-358. 2006.
- KANDA, S.; OKUBO, K.; OKA, Y. Differential regulation of the luteinizing hormone genes in teleosts and tetrapods due to their distinct genomic environments – insights into gonadotropin beta subunit evolution. **General and Comparative Endocrinology**, vol.173, n.2, p.253–258. 2011.
- KOULISH, S.; KRAMER, C. R.; GRIER, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, vol.254, p.292-311, 202.
- LEAL, M. C.; DE WALL, P. P.; GARCIA-LOPEZ, A.; CHEN, S. X.; BOGERD, J.; SHULZ, R. W. Zebrafish primary testis tissue culture: An approach to study testis function ex vivo. **General and Comparative Endocrinology**, vol.162, n.2, p.134-138. 2009.
- MIURA, T.; MIURA, C.; KONDA, Y.; YAMAUCHI, K. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. **Development**, vol.129, p.2689-2697. 2002.
- NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4th ed., New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 601p., 2006.
- NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, vol.35, p.197-206. 2009
- NÓBREGA, R. H.; GREEBE, C. D.; VAN DE KANT, H.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ, R. W. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. **PLoS One**, vol.5, n.9,p.e12808. 2010.

- OATLEY, J. M.; BRINSTER, R. L. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. **Physiological Reviews**, v.92, n.2, p.577- 595. 2012.
- OHTA, T.; MIYAKE, H.; MIURA, C.; KAMEI, H.; AIDA, K.; MIURA, T. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Biology of Reproduction**, vol.77, n.6, p.970-977. 2007.
- PALA, I.; KLÜVER, N.; THORSTEINSDÓTTIR, S.; SCHARTL, M.; COELHO, M. M. Expression pattern of Anti-Müllerian hormone (Amh) in the hybrid fish complex of *Squalius alburnoides*. **Gene**, vol.410, n.2, p.249–258. 2008.
- PUDNEY, J. Comparative cytology of the no-mammalian vertebrate Sertoli Cell. In: RUSSELL, L. D. e GRISWOLD, M. D. editors. **The Sertoli cell**. Clearwater, F. L: Cache River Press, p.612-657, 1993.
- PUDNEY, J. Spermatogenesis in no-mammalian vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, vol.32, p.459-497, 1995.
- ROOIJ, D. G. de. Rapid expansion of the spermatogonial stem cell tool box. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol.103, n.21, p.7939-7940, 2006a.
- ROOIJ, D. G. de. Regulation of spermatogonial stem cell behavior *in vivo* and *in vitro*. **Animal Reproduction**, vol.3, n.2, p.130-134, 2006b.
- ROOIJ, D. G. de; RUSSEL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal Andrology**, vol.21, p.776-798. 2000.
- RUSSELL, L. D., ETTLIN, R. A., SINHA HIKIM, A. P., CLEGG, E. D. Histological and histopathological evaluation of the testis. **Cache River Press, Clearwater**, Florida, 2006.

- SAMBRONI, E.; ROLLAND, A. D.; LAREVRE, J-J.; GAC, F. L. Fsh and Lh have common and distinct effects on gene expression in Rainbow trout testis. **Journal of Molecular Endocrinology**, vol.50, n.1, p.1-18. 2012.
- SCHULZ, R. W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P. Sertoli cell proliferation in the adult testis – evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology of Reproduction**, vol.73, p.891-898, 2005.
- SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H. Anatomy and histology of fish testis. **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**, vol.1, p.616-626. 2011a.
- SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H. Regulation of spermatogenesis. **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**, vol.1, p.627-634. 2011b.
- SCHULZ, R. W.; FRANÇA, L. R; LAREYE, J. J.; LE GAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NÓBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, vol.165, p.390-411. 2010.
- SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, vol.26, p.43-56. 2002.
- SKAAR, K. S*.; NÓBREGA, R. H*.; MAGARAKI, A.; OLSEN, L.C.; SCHULZ, R. W.; MALE, R. Proteolytical activated, recombinant Anti-Müllerian Hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. **Endocrinology**, vol.152, n.9, p.3527-3540. 2011.* equally contributed.
- VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G. B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis in teleost: insights from Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology Biochemistry**, vol.28, p.187190, 2003.

VISCHER, H. F.; TEVES, A. C.; ACKERMANS, J. C.; VAN DIJK, W.; SHULZ, R. W.; BOGERD, J. Cloning and spatiotemporal expression of the follicle-stimulating hormone beta subunit complementary DNA in the African Catfish (*Clarias gariepinus*). **Biology of Reproduction**, vol.68, n.4, p.1324-1332. 2003.

WANG, D. S.; JIAO, B.; HU, C.; HUANG, X.; LIU, Z.; CHENG, C. H. Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol.367, n.2, p.336–341. 2008.

OBJETIVOS

Objetivos gerais e específicos

Objetivo geral

Identificar o nicho espermatogonial, verificar a localização, expressão e atividade do hormônio Anti-Mülleriano na espermatogênese de carpa comum, *Cyprinus carpio*.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar o nicho espermatogonial;
- 2) Clonar o gene *amh* da carpa comum;
- 3) Detectar através de hibridização *in situ* os sítios de expressão do gene *amh*;
- 4) Desenhar *primers* específicos para o gene *amh* de carpa comum para PCR quantitativo em tempo real (*qPCR*), validar os *primers* e testar sua eficiência;
- 5) Avaliar a expressão do *amh* em condições *in vivo*, assim como verificar a regulação endócrina *in vitro* (cultura de tecido) sob influência de Fsh e estrógenos;
- 6) Associar o padrão de expressão do *amh* com a proliferação celular dos tipos celulares presentes no testículo.

CAPÍTULO 2

NICHO ESPERMATOGONIAL EM *Cyprinus carpio* e PAPEL DO Amh NA ESPERMATOGÊNESE

Capítulo 2

Introdução

A carpa comum é da família Cyprinidae e teve sua origem na Ásia (KOEHN *et al.*, 2000; GOODBRED *et al.*, 2013). Rapidamente se espalhou por todo o mundo e hoje é a espécie de interesse econômico mais produzida mundialmente e a segunda mais produzida no Brasil (94.579 toneladas) (FAO, 2013).

Se por outro lado, a carpa comum representa a espécie mais importante na produção aquícola mundial (HENKEL *et al.*, 2012), por outro, serve como modelo experimental em diferentes campos da pesquisa (JI *et al.*, 2012). Em carpa comum, assim como em outras espécies de peixes teleósteos, a espermatogênese ocorre no interior de estruturas denominadas espermatócistos, ou cistos, que se formam quando uma espermatogônia indiferenciada do tipo A é completamente envolvida pelos prolongamentos das células de Sertoli (SCHULZ *et al.*, 2010). Um aspecto importante das células de Sertoli para a espermatogênese é a sua proliferação, pois, no período de proliferação mitótica das espermatogônias, as células de Sertoli se proliferam para suportar o crescimento em número das células germinativas que se dividiram sincronicamente para formarem clones (SCHULZ e NÓBREGA, 2011). Além disso, as células de Sertoli são responsáveis por produzir diversos fatores de crescimento de suma importância para o desenvolvimento da espermatogênese (KIN *et al.* 2014). Este processo é dependente de uma organização espacial e temporal, tanto das células germinativas, como das células somáticas, de Sertoli e Leydig (MARÍN-JUEZ *et al.* 2013).

A espermatogênese é um processo altamente organizado e coordenado, capaz de suportar a produção diária de milhões de espermatozoides. Este processo é mantido através da auto-renovação e diferenciação das espermatogônias tronco (ALVARENGA e FRANÇA, 2009; NÓBREGA *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010; REZAA *et al.*, 2014). Tais fenômenos (auto-renovação ou diferenciação) são dependentes de sinais extrínsecos e oriundos do ambiente (nicho espermatogonial) onde estas células se encontram. O balanço destes sinais é de extrema importância para a ativação das espermatogônias troncos e

também de sua sobrevivência nos testículos (REZAA *et al.*, 2014). Em testículos de *Danio rerio* (NÓBREGA *et al.*, 2010) e *Oreochromis niloticus* (LACERDA *et al.*, 2013) foram identificadas como células tronco, as espermatogônias indiferenciadas do tipo A (Aund), e o nicho espermatogonial caracterizado.

Em espécies como *Danio rerio* (NÓBREGA *et al.*, 2010) e em mamíferos, como o *Tayassu tajacu* (CAMPOS-JUNIOR *et al.*, 2012) o nicho foi identificado entre regiões dos túbulos seminíferos, que são adjacentes ao compartimento intersticial, já em *Alcolapia grahami* (PAPAH *et al.*, 2013) é situado próximo a região distal do lóbulo.

Apesar de desempenhar um importante papel no destino das espermatogônias tronco, a composição molecular e celular do nicho espermatogonial para a maioria dos vertebrados, incluindo os peixes, ainda é desconhecido.

Além da identificação do nicho espermatogonial e dos candidatos a células tronco, é também de suma importância conhecer os sinais endócrinos e parácrinos, que são produzidos no nicho e influenciam no destino (diferenciação ou auto-renovação) destas células tronco.

Os principais hormônios gonadotrópicos, que atuam no nicho espermatogonial, são o Lh (hormônio luteinizante), que atua na função das células de Leydig, e o Fsh (hormônio folículo estimulante), o qual regula as funções das células de Sertoli (SCHULZ *et al.*, 2010; ZOHAR *et al.*, 2010), inibindo ou estimulando a produção de fatores de crescimento (ZOHAR *et al.*, 2010). Em *Scomber japonicus*, o Fsh estimula a entrada da puberdade com o início da espermatogênese em 164 dias após a fertilização (NYUJI *et al.*, 2014). Já em *Dicentrarchus labrax*, o Fsh desencadeia o processo da espermatogênese em machos pré-puberes, iniciando assim, a proliferação espermatogonial até a entrada da meiose (MAZÓN *et al.*, 2013). Entretanto, o papel do Fsh na espermatogênese dos peixes teleósteos, permanece ainda desconhecido. Até o presente momento, descobriu-se que o Fsh regula fatores parácrinos estimulatórios e inibitórios, importantes para a proliferação e diferenciação das células germinativas. Além disso, o Fsh estimula as células de Leydig a produzirem andrógenos, que por sua vez vão regular a expressão de diversos genes, considerados relevantes para regular o início da proliferação e diferenciação das células germinativa, como *slc26a4*, *vt1*, *igfbp6* entre outros. Nas

células de Sertoli, o Fsh estimula a liberação de fatores de crescimento, os quais interferem na atividade proliferativa das células germinativas. Dentre eles, o hormônio Anti-Mülleriano (Amh) (MIURA *et al.* 2002; SKAAR e NÓBREGA *et al.*, 2011; SAMBRONI *et al.*, 2013a; SAMBRONI *et al.*, 2013b).

O Amh é um membro da família TGF- β (transforming growth factor-beta), com importante papel na regressão do ducto de Müller durante a diferenciação sexual masculina de tetrápodes (JOSSO *et al.*, 2006). Em mamíferos a expressão do *amh* é de suma importância para o desenvolvimento dos órgãos genitais, onde níveis elevados são produzidos pelas células de Sertoli no início da diferenciação testicular até a puberdade, e níveis mais baixos são produzidas pelas células da granulosa do ovário após o nascimento (REY, 1998) inibindo a formação dos folículos ovarianos primordiais (NILSSON *et al.*, 2011).

O Amh desempenha importante papel no desenvolvimento gonadal de peixes, sendo expresso em maior quantidade em machos do que nas fêmeas. Desta forma, o Amh deve ser importante para a diferenciação gonadal masculina. Em hermafroditas, por exemplo, níveis elevados de Amh estão associados com o início da diferenciação testicular (WU *et al.*, 2010; WU e CHANG, 2013).

Em *Lateolabrax japonicas*, o *amh* possui elevados níveis de expressão em testículos imaturos, sendo que, quando as espermatogônias entram em proliferação e diferenciação (meiose), ocorre uma queda brusca em sua expressão (CHI *et al.*, 2014).

Em *Oncorhynchus mykiss*, a expressão do *amh* é inibida, quando na presença de testosterona e 11-Ketotestosterona (principal andrógeno nos peixes) produzidas pelas células de Leydig, que induzem a produção de fatores de crescimento pró-diferenciação pelas células de Sertoli (ROLLAND *et al.*, 2013), e sua expressão em diferentes órgãos, como: cérebro, olhos, rim e gônadas, são maiores nos machos do que nas fêmeas (POONLAPHDECHA *et al.*, 2011). No entanto, pouco se sabe sobre seu papel na espermatogênese e função testicular de machos adultos. Em zebrafish, *Danio rerio*, o Amh inibe a diferenciação espermatogonial mantendo as espermatogônias tronco em seu estado indiferenciado e também apresenta um efeito inibitório nas células de Leydig sob a liberação de andrógenos induzida por Fsh (SKAAR e NÓBREGA *et al.*, 2011).

Além disso, os mecanismos e os componentes envolvidos na regulação do *amh* que levam à inibição da diferenciação espermatogonial são poucos

estudados, e tal conhecimento poderia ser utilizado, por exemplo, para atrasar a puberdade precoce exibida por espécies de interesse comercial em cativeiro.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar o nicho espermatogonial, clonar o gene *amh* na carpa, verificar seus sítios de expressão e associar sua expressão com a atividade proliferativa das espermatogônias, células de Sertoli e células intersticiais no início do ciclo reprodutivo da carpa comum, *Cyprinus carpio*.

Materiais e métodos

Animais

Vinte carpas comuns adultas, sexualmente maduras, foram alojadas em caixas de fibra com capacidade para 200 litros, mantidos na temperatura de 28° C. Os animais foram pesados e anestesiados por imersão em solução de Benzocaína a 1%, para que então, recebessem os devidos tratamentos descritos abaixo. Todos os procedimentos usados seguiram as diretrizes para o tratamento ético dos animais. O projeto experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, sob protocolo de número 02248/14.

Caracterização do nicho espermatogonial, e duração da espermatogênese em carpa comum

Para tanto, os animais receberam pulsos de BrdU na concentração de 150 mg/kg durante 3 dias consecutivos de acordo com modificações de Nóbrega e seus colaboradores (2010). Os animais (n=5 por período de tempo avaliado) foram sacrificados imediatamente com 4 horas, 1 semana, 2 e 3 semanas (4h, 1w, 2w, 3w respectivamente) após receberem o último pulso de BrdU. Os testículos foram fixados em methacarn (60% metanol absoluto, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) por 2 horas em temperatura ambiente, processados, incluídos em historesina (Technovit 7100-Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany,

<http://www.kulzertechnik.de>), seccionados com 5 μm e submetidos à imunodeteção de BrdU descrito anteriormente por Van de Kant e De Rooij (1992).

A porcentagem de células BrdU-positivas para espermatogônias indiferenciadas (Aund* e Aund), células de Sertoli e células de Leydig foram determinadas pela contagem do número de células marcadas no total de células avaliadas (positivas e negativas ao BrdU) durante os diferentes períodos de tempo após o último pulso de BrdU. Para a caracterização das Aund* e Aund, os seguintes critérios foram baseados nos estudos com testículos de zebrafish: o tipo Aund* de núcleo irregular, cromatina finamente granular, e grande quantidade de “nuages” (ver abaixo), e o tipo Aund com núcleo arredondado, cromatina condensada e poucas “nuages” (Figura 1) (LEAL *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2010; NÓBREGA *et al.*, 2010).

Para determinar o nicho espermatogonial foram observados a distribuição espacial das Aund* e Aund BrdU-positivas, as quais foram determinadas pela contagem do número de células situadas: 1) próximas a região do interstício, ou 2) próximas da região intertubular. Além disso, o número de células de Sertoli positivas ao BrdU foi determinada pela contagem do número de células de Sertoli “free” (sem associação com células germinativas), e o número de células de Sertoli associadas com algum tipo de células germinativa. Também foi determinado a localização (próxima do interstício ou intertubular) dos dois tipos de células de Sertoli mencionados. Os valores foram expressos como porcentagem de células BrdU-positivas nas mencionadas regiões para avaliar se a distribuição dessas células segue um padrão aleatório ou específico. Quanto a duração da espermatogênese, foram analisadas a proliferação das células germinativas BrdU-positivas, que estavam em processo de diferenciação mais avançado e, que retiveram BrdU após o último pulso nos diferentes períodos de tempo.

Clonagem e caracterização do gene *amh* em carpa comum

Para caracterização do gene *amh*, os animais foram dissecados e seus testículos removidos e congelados em nitrogênio líquido. A extração do RNA total foi realizada de acordo com o método do *TRizol* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e

FastRNA Pro Green kit (MP Biomedicals, Solum, OH, USA). Para evitar contaminação genômica, as amostras foram tratadas com o *DNase I* kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) antes da síntese de cDNA de acordo com o fabricante. A síntese de cDNA foi realizada em seguida com random hexamers e o uso de *Superscript II*, de acordo com o fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Clonagem e Sequenciamento

Os *primers* (Tabela 1) para a caracterização do gene *amh* em carpa comum foram baseados em sequências do zebrafish (*Danio rerio* – número de depósito no NCBI: AY721604) e goldfish (*Carassius auratus* – número de depósito no NCBI: JX413514) (evolutivamente relacionados com a carpa), depositadas no banco de dados público internacional da *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os *primers* (Tabela 1) utilizados para iniciar a clonagem são os de nome CarpFw1 e CarpRv3a, que foram baseados no domínio TGF- β do gene *amh*, que é o domínio mais conservado do gene.

Tabela 1. Lista de primers utilizados para: RT-PCR: transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase; qPCR: PCR quantitativo em tempo real; construção da sonda de hibridização. Obs.: Acesso número de depósito no NCBI (*National Center for Biotechnology Information (NCBI)*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Gene	Sequência do Primer 5'-3'			Pares de Base	
	Nome	Tipo	Acesso		Primer Forward
CarpFw1 e CarpRv3a	RT-PCR	JX413514; AY721604	TTCCTCTGTGAGCTGC AAAAGTTCT	TCCACACAGGGACGCAGCA	720
CarpFw1 β -actin e CarpRv2 β - actin	RT-PCR	M24113.1	TGACCTGACAGACTACCTCA	AGCTCATAGCTCTTCTCCAG	177
CarpT3Fw e CarpT7Rv	Sonda Hibridização	KF640084; JX413514; AY721604	GGAGTGTCAATCCACACAGAGTCCCTGCTATCA	GGACACGGACAAGCTCTGAAGCCCGA	490
CarpFw4144 e CarpRv4145	qPCR	KF640084; JX413514; AY721604	ACAAAAAACGAAGTGGCCTCAA	TCCTTCTCAGCATCCCCAAATATCT	123

Os produtos amplificados com os *primers* foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e as bandas com o peso molecular esperado foram extraídos do gel. Os produtos foram purificados por QUIAEX II Agarose Gel Extraction Handbook (QUIAGEN), e clonados em pcDNA3.1/V5-His TOPO vector (Invitrogen, Breda, The Netherlands). Em seguida, os plasmídeos foram transformados em *Escherichia coli* quimicamente competentes e estas foram semeadas em meio de cultura Luria-Bertania (LB) contendo 1% de penicilina. Múltiplas colônias foram expandidas em cultura líquida de meio LB contendo 1% de penicilina. Destas colônias, os clones com a presença do inserto de interesse foram selecionadas por PCR. Depois disso, minipreps foram obtidos usando o *QIAprep Miniprep Handbook* (QUIAGEN) e submetidos a uma reação de sequenciamento utilizando *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* de acordo com a recomendações do fabricante.

A obtenção do cDNA parcial para o gene *amh* foi confirmada por alinhamento com outras sequências já depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando interface de BLASTN. A fim de obter o cDNA de comprimento completo para o *amh*, a técnica RACE PCR foi realizada usando o SMART RACE cDNA amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) com módulo *II SuperScript RT* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo do Kit. Foram utilizados 2 µg de RNA total tratado, e um oligo de RNA, que foi ligado ao extremo 5' do mRNA utilizando *RNA ligase* de T4. Após a transcrição reversa, utilizando *SuperScript II RT*, foram realizadas as reações de PCR com seus *primers* específicos para a sequência. Os *primers* específicos para o gene foram desenhados a partir de sequências parciais anteriormente obtidas e colocadas adaptadores.

A técnica de amplificação com o RACE 3' e 5', consiste em um PCR com adaptadores, para amplificar o gene por inteiro, tanto no sentido 3' e 5' da fita de DNA. Este sistema é adequado para a amplificação rápida das extremidades de cDNA (RACE) e PCR ancorado entre um ponto definido dentro de mRNA e a 3' poli (A) da extremidade. O sistema é útil para a amplificação de mensagens para o qual as informações são raras e a sequência disponível é pequena, então ajudando na captura da extremidade 3' do mRNA de informação final.

Comparação de domínios proteicos conservados e análise evolutiva

A sequência obtida (1704 pares de base) foi codificada em uma proteína de 567 aminoácidos que é altamente homóloga aos outros precursores de *amh* através da plataforma *ORF Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Posteriormente, a sequência foi comparada com outras sequências de aminoácidos depositadas no banco de dados do servidor NCBI, nas quais foram realizados alinhamentos múltiplos com o *ClustalX alignment software*, que faz parte do pacote MEGA v.6.06 (versionLabel) e, adicionalmente, alinhamentos com a ferramenta *Clustalw2* disponível no servidor do *The European Bioinformatics Institute (EBI)* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), afim de se localizar os sítios conservados das sequências de aminoácidos. Para determinar os possíveis domínios da proteína, utilizou-se o pacote de ferramentas disponíveis no servidor *Pfam* (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

As análises evolutivas foram conduzidas pelo método Neighbor joining (NJ), que determina a distância filogenética, utilizando uma busca heurística com 1000 réplicas de iniciação. Os resultados foram obtidos usando o software MEGA versão 6.06, onde um cladograma de consenso foi gerado sem enraizamento.

Avaliação da expressão do *amh* em diversos tecidos

A expressão do *amh* em diferentes tecidos/órgãos (cérebro, brânquias, coração, fígado, músculo, intestino, olhos, testículos e ovários), em ambos os sexos foi realizada por *RT-PCR* (Transcrição Reversa – PCR) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Para tanto, RNA total dos diferentes tecidos foi extraído, seguido de tratamento com DNase e síntese de cDNA de acordo com protocolos dos fabricantes. Reações de RT-PCR e qPCR foram realizadas utilizando conjunto de *primers* específicos (ver Tabela 1) para o gene *amh* baseados na sequência completa para a carpa comum.

Também foram utilizados um conjunto de *primers* para a sequência parcial do gene *β -actina* (177 pares de base) como gene de referência para os RT-PCR, desenhados através de sequência de *β -actina* de carpa comum (ncbi: M24113.1) (Tabela 1).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, e as bandas comparadas e observadas em relação ao peso molecular e fotografadas.

Para as análises de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) as reações foram realizadas com SYBR Green kit (Invitrogen), para os fragmentos amplificados de cDNA do gene *amh*. As reações com *18S* (human *18s* rRNA – Invitrogen) foram utilizadas com o TaqMan kit (Invitrogen). Ambas reações foram de acordo com o protocolo do fabricante, usando uma concentração final de 900 nM para cada um dos *primers*, com 1000 ng de RNA total inicial. As duplicatas foram executadas para cada amostra. Os níveis de mRNA (Cts) foram normalizados pelo gene de referência o *18S* e posteriormente normalizados em relação ao testículo.

Os Cts foram determinados através do 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em reações de 20 µl, utilizando como master mix Syber Green ou TaqMan, analisados com o IDT SciTools OligoAnalyzer 3.1 Software (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).

Hibridização *in situ*

Sondas de RNA foram construídas no intuito de serem utilizadas para identificar seu sítio de expressão através de hibridização *in situ* conforme Shen e seus colaboradores (2013) e especificações do fabricante Roche (protocolo: 11758888001).

Para a construção das sondas, foram adicionados aos *primers* dos genes alvos, sequencias promotoras T3 e T7 (promotores da RNA polimerase) nos *primers forward* e *reverse*, respectivamente (Tabela 1). O produto esperado da PCR foi extraído, purificado com Zymoclean DNA recovery kit (Sinapse D4001) e submetido à transcrição utilizando-se DIG-UTP (digoxigenina) e RNA polimerase T7 (anti-senso) ou T3 (senso). Assim, 20µl de reação contendo: cDNA molde linearização 1 µg, 1 µl de mistura de dNTP, 2 µl de ditionotreitolo 100 mM (DTT), 4 µl de tampão de transcrição 5x, 1 µl de inibidor de RNase, 1 µl de RNA T7 polimerase e H₂O+ dietil-pirocarbonato (DEPC) foram incubados à 37°C por 2h.

Em seguida, 1 µl DNase I (Invitrogen) foi adicionada à solução por 20 min à 37°C. O produto final da reação foi precipitado, purificado e armazenado a -80°C.

Para hibridização, os testículos foram fixados overnight em paraformaldeído 4% tamponado (pH7,4) em condições livres de RNAses, depois desidratadas em metanol e armazenadas em -20°C até a realização da técnica. O material foi então re-hidratado e tratado com proteinase K (20ug/ml) à 37°C por 20min, re-fixados, e incubados com solução de pré-hibridização à 70°C por 2,5hrs. Após a denaturação da sonda através de choque térmico, o tecido foi incubado com solução de hibridização com a sonda de RNA do gene alvo à 70°C overnight. No segundo dia, a solução de hibridização foi removida, os testículos lavados intensivamente com tampão SSC (Cloreto de Sódio e Citrato de Sódio) e bloqueados durante 1h à temperatura ambiente com 1% de reagente de bloqueio (“*blocking reagent*”) (Roche). Em seguida, o material foi incubado com anticorpo primário anti-DIG-AP (AP, fosfatase alcalina) na diluição de 1:2000 na mesma solução de bloqueio à 4°C overnight. No terceiro dia, os testículos foram lavados, incubadas com solução de levamisol no intuito de bloquear os sítios inespecíficos da fosfatase alcalina. Em seguida, uma parte do material foi revelado para fluorescência com HNPP/Fast Red TR mix de acordo com especificações do fabricante (Roche) e outra parte do material foi revelado com o substrato NBT (Nitrotetrazolium Blue chloride) e BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt) para a Hibridização *in situ* não fluorescente. Para fluorescência, DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) foi utilizado para identificação dos núcleos.

O material foi fotografado em microscópio a laser com confocal invertido Leica TCS SP 5, do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu e em microscópio invertido do laboratório do Grupo de Reprodução e Biologia Molecular do departamento de Morfologia da UNESP/Botucatu.

Cultura de Tecidos e análise de expressão gênica por PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

Para se estudar o efeito de alguns hormônios na expressão do *amh*, foi utilizado um sistema *in vitro* de cultura para testículos de acordo com Leal e

colaboradores (2009). Os fragmentos de testículos de aproximadamente 1 mm foram cultivados em meio de cultura Leibovitz (L-15), onde foram distribuídos da seguinte forma: 12 fragmentos em condições basais (apenas L-15), e 12 em condições contendo o hormônio a ser testado. Os fragmentos repousaram sobre blocos de ágar e papel filtro de nitrocelulose. Para cada experimento, foram utilizados 5 testículos (n=5 carpas), 12 fragmentos por condição, com uma réplica de cada testículo em cada condição (basal e tratado). Os testículos foram incubados em placas de 24 poços, contendo 1 ml de meio por poço à 28°C por 18 horas e 7 dias (com troca do meio a cada 3 dias). Logo após, foi realizado a extração de RNA total (método do *TRIZOL*), seguido por síntese de cDNA de acordo com procedimentos usuais (NÓBREGA *et al.*, 2010), para posteriores análises da expressão gênica do *amh*. A expressão do *amh* foi avaliada nos seguintes tratamentos hormonais; recombinante de zebrafish Fsh (rzf Fsh) nas concentrações de 50, 100 e 1000 ng/ml e β -estradiol (E2) nas concentrações de 10 e 100 nM e 1 μ M. As análises de expressão gênica foram realizadas através de reações de *qPCR* utilizando-se *primers* específicos (Tabela 1). Os níveis de mRNA (Cts) foram normalizados pelo gene de referência o *18S* (dCt), e em seguida expressos com valores relativos à média dos Cts do grupo basal (ddCt).

Expressão gênica do *amh* durante diferentes estágios reprodutivos através de PCR quantitativo em tempo real (*qPCR*)

Machos adultos em diferentes estágios do ciclo reprodutivo foram coletados. Parte de seus testículos foi fixado em methacarn e karnovsky para análises histológicas, e outra parte rapidamente congelada em nitrogênio líquido para análises de expressão gênica. Após classificação dos estágios pela histologia, os testículos foram agrupados de acordo com o mesmo estágio gonadal. Desta forma, os testículos de um mesmo estágio gonadal tiveram seu RNA total extraído, seguido de síntese de cDNA de acordo com procedimentos usuais mencionados acima. A expressão do *amh* nos diferentes estágios reprodutivos foi feita através de reações de PCR quantitativo em tempo real (*qPCR*) utilizando-se *primers* específicos (Tabela 1). Os níveis de mRNA (Cts) foram normalizados pelo gene de referência o *18S* (dCt), e em seguida expressos com valores relativos à média dos Cts de todos os animais (ddCt).

Imunohistoquímica - *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)*

Para avaliar a proliferação celular, fragmentos de testículos de carpa em diferentes estágios do ciclo reprodutivo foram fixados em methacarn, processadas em parafina e seccionadas com 5 μm . As lâminas foram desparafinizadas, e submetidas à imunodeteção do PCNA. O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) é definido como uma ciclina, que é encontrada e também expressa em altos níveis durante o ciclo celular (AMENDRAL *et. al.*, 1987), mais precisamente na fase S do ciclo celular (TAKAHASHI e CAVINESS 1993). Em seguida, a técnica de recuperação antigênica foi empregada utilizando-se a solução tampão de citrato, 0,01 M (pH 6,0), em um forno de microondas, por cinco minutos. Esta técnica foi realizada por duas vezes consecutivas. O bloqueio da reação não específica foi executado utilizando-se 3% de leite desnatado e seções do material incubado com anticorpo primário monoclonal de rato anti-PCNA (Novo Castra NCL-PCNA) (1:100). Depois de lavadas em PBS (phosphate buffered saline) (pH 7,4), o material foi incubado em anticorpo secundário universal. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com complexo ABC (Avidina-Biotina-Peroxidase, complex-Easy Path). O material foi revelado com DAB (3,3-diaminobenzidina tetracloridrato) (Sigma) contendo 0,01% de H_2O_2 em tampão PBS. Após a imunomarcção, os cortes histológicos foram contra-coradas em hematoxilina e as células PCNA-positivas foram observadas. Para determinar o padrão de proliferação das células, foram realizadas contagens das células PCNA-positivas e negativas de um total de 100 células. Os valores foram expressos como porcentagem do número de células negativas e positivas ao PCNA.

Análises estatísticas

Os resultados apresentados estão expressos através de média \pm EP (erro padrão). As diferenças foram identificadas usando Student-*test* (não pareado) ($p < 0.05$). Comparações entre as médias (entre os diferentes grupos; mais de 2) foram realizadas utilizando one-way ANOVA seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). O software Graph Pad Prism 4.0 (Graph Pad Software,

Inc., San Diego, CA, USA, <http://www.graphpad.com>) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

Resultados

Candidatos à células tronco e caracterização do nicho espermatogonial

Células Germinativas

Para analisar a possível existência de candidatos às células tronco no testículo, assim como determinar a localização do nicho espermatogonial na carpa comum, BrdU na concentração de 150 mg/kg foi injetado durante três dias consecutivos. Após a última injeção de BrdU (pulso), os testículos foram coletados após 4h, 1, 2 e 3 semanas para imunodeteção do BrdU. Esta metodologia consiste em dar pulsos de BrdU, o qual é um marcador de células em proliferação, que se incorpora na fase S (duplicação do DNA) do ciclo celular. Após os pulsos, as células que retiverem o BrdU por longo tempo são células que possuem longo ciclo celular, ou células quiescentes, como as células tronco. Portanto, esta metodologia serve para detectar possíveis candidatos de células tronco, assim como sua localização no testículo e a cinética de perda do BrdU entre as células-filhas, como já realizado por Nóbrega e seus colaboradores (2011). Em zebrafish, dois tipos de espermatogônias iniciais foram descritas como células tronco; Aund* (clara, volumosa e com núcleo irregular) e Aund (escura, menos volumosa e com núcleo redondo). Com base na morfologia, estes dois tipos de espermatogônias também foram encontrados na carpa (Figura 1). Dentro da metodologia de retenção do BrdU (*“label-retaining cell”*), as espermatogônias Aund* e Aund foram as únicas células diploides que retiveram BrdU, 3 semanas após o último pulso do mesmo (Figura 2G,H). Espermatozoides também se encontram marcados, no entanto estes são resultantes das células que incorporaram BrdU e prosseguiram no processo da espermatogênese. Tanto Aund* como Aund retiveram BrdU ao longo de todo o período avaliado (Figura 2A-H). Também foi possível realizar a cinética de perda de BrdU nas Aund* e Aund (Figura 3A). Interessantemente, as espermatogônias Aund* retiveram o BrdU ao

longo de todo período avaliado, enquanto que o BrdU foi diluído rapidamente entre as células-filhas das espermatogônias Aund (Figura 3A). Estes dados sugerem que as espermatogônias Aund* e Aund apresentam-se como fortes candidatas a espermatogônias tronco, com diferentes cinéticas de ciclo celular, Aund* sendo células quiescentes, enquanto que Aund mais ativas. Vale mencionar que estudos em nosso laboratório mostram que estas células expressam marcadores de células-tronco como *oct4* e *grfalpha1*.

Também foi avaliado a localização das Aund* e Aund marcadas com BrdU, 3 semanas após o último pulso de BrdU. Esta localização baseia-se no posicionamento destas células no compartimento germinativo; se próximas das regiões do interstício, ou se na região entre dois túbulos (intertubular). As contagens mostram que em torno de 80% das Aund* estão localizadas próximas à região intersticial (Figuras 2C,3B), enquanto que 85 % das Aund mostraram preferência pela região intertubular (Figuras 2B,3C).

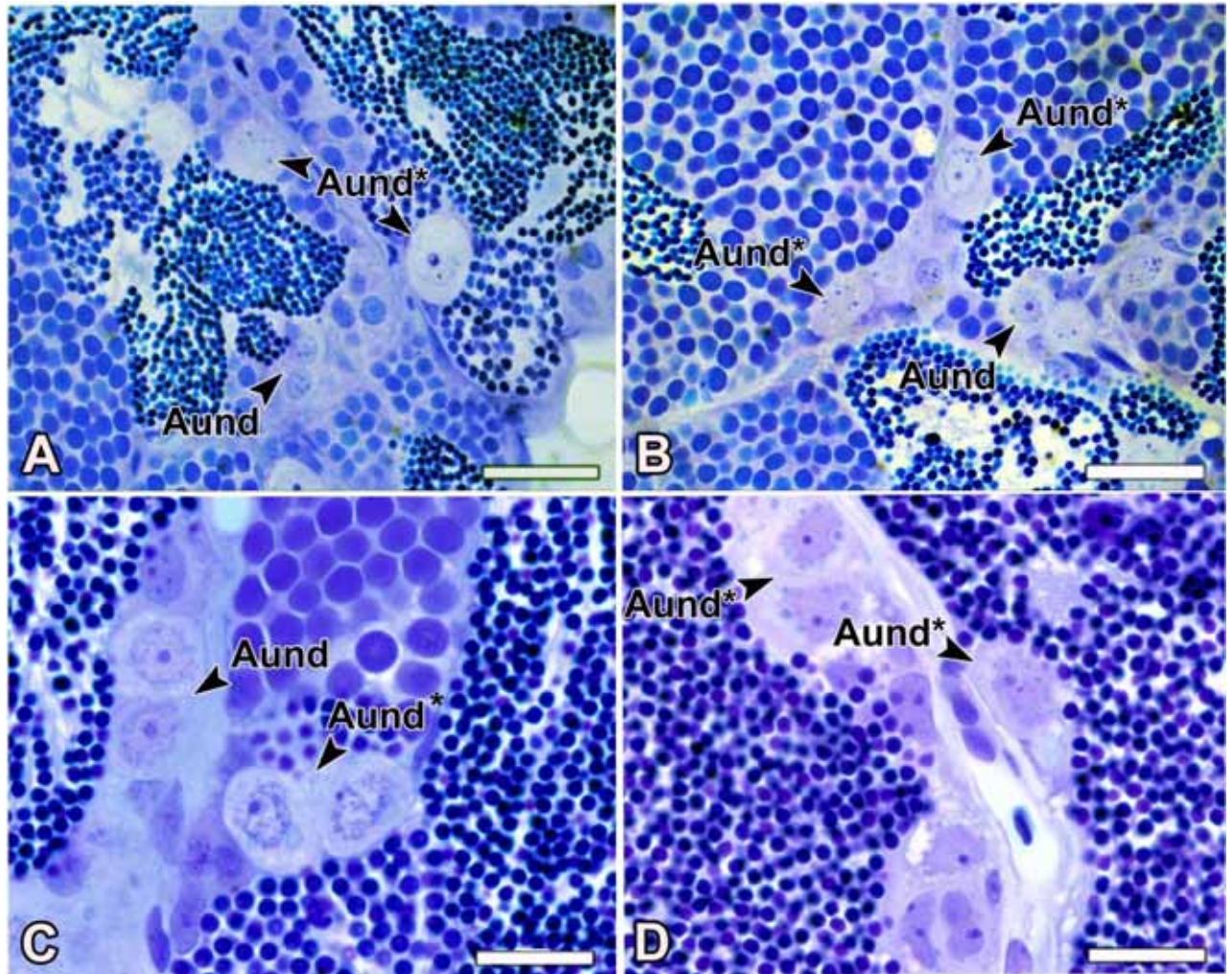


Figura 1. Morfologia testicular de carpa comum em azul de toluidina. (A - D): é possível observar espermatogônias do tipo A indiferenciadas, as quais foram classificadas de acordo com sua morfologia, onde: Aund* (células “reserva”) e Aund (células “ativas”). Barras de escala: 100 μm.

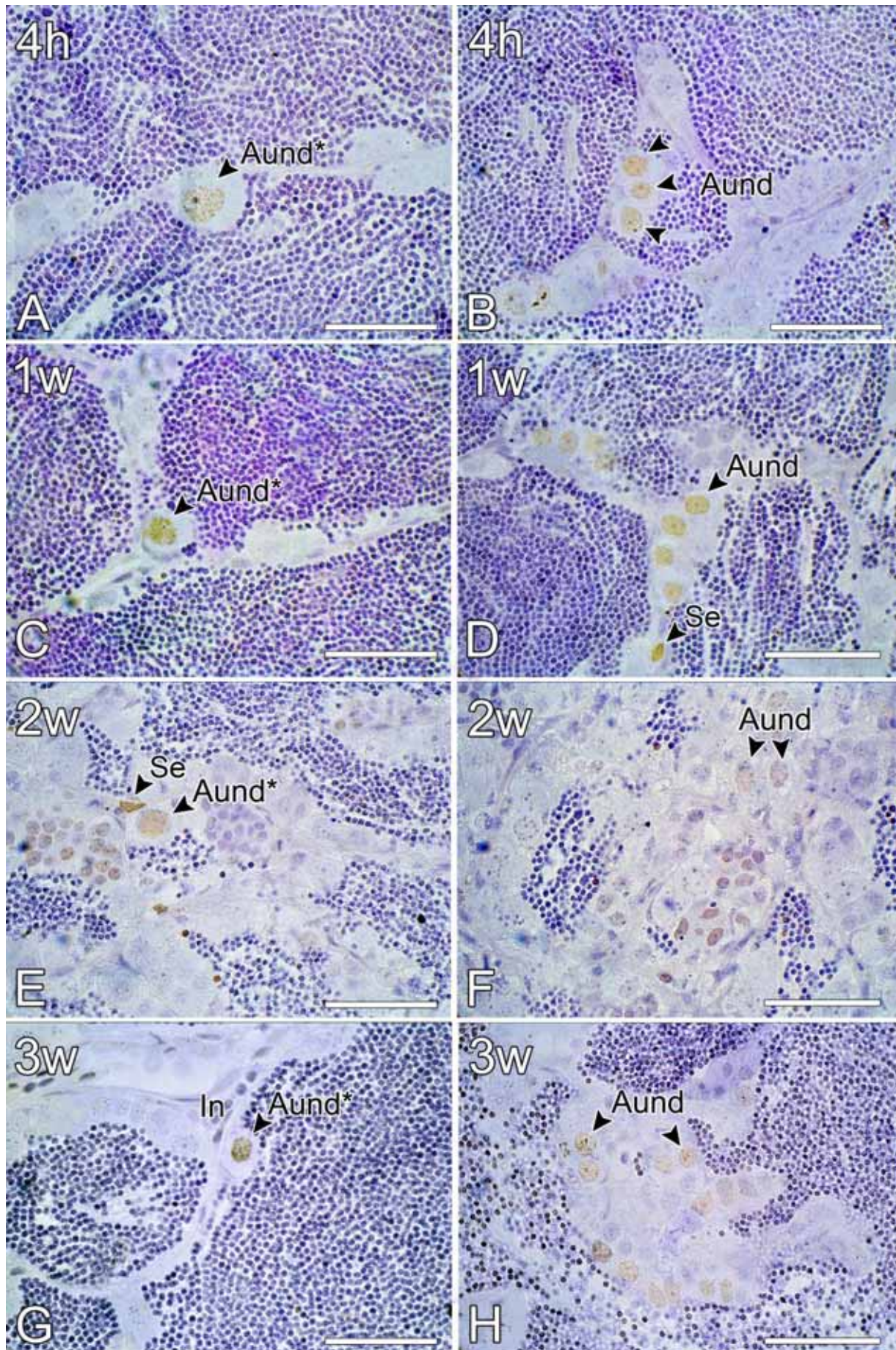


Figura 2. Imunodeteção do BrdU nas células germinativas após 3 semanas do último pulso. **(A-B)** espermatogônias do tipo A indiferenciadas (Aund* e Aund) BrdU-positivas após 4h, **(C-D)** 1w, **(F-G)** 2w e **(H-I)** 3w após o último pulso de BrdU. (Se) células de Sertoli BrdU-positivas. (In) região intersticial. Barras de escala: 50 µm.

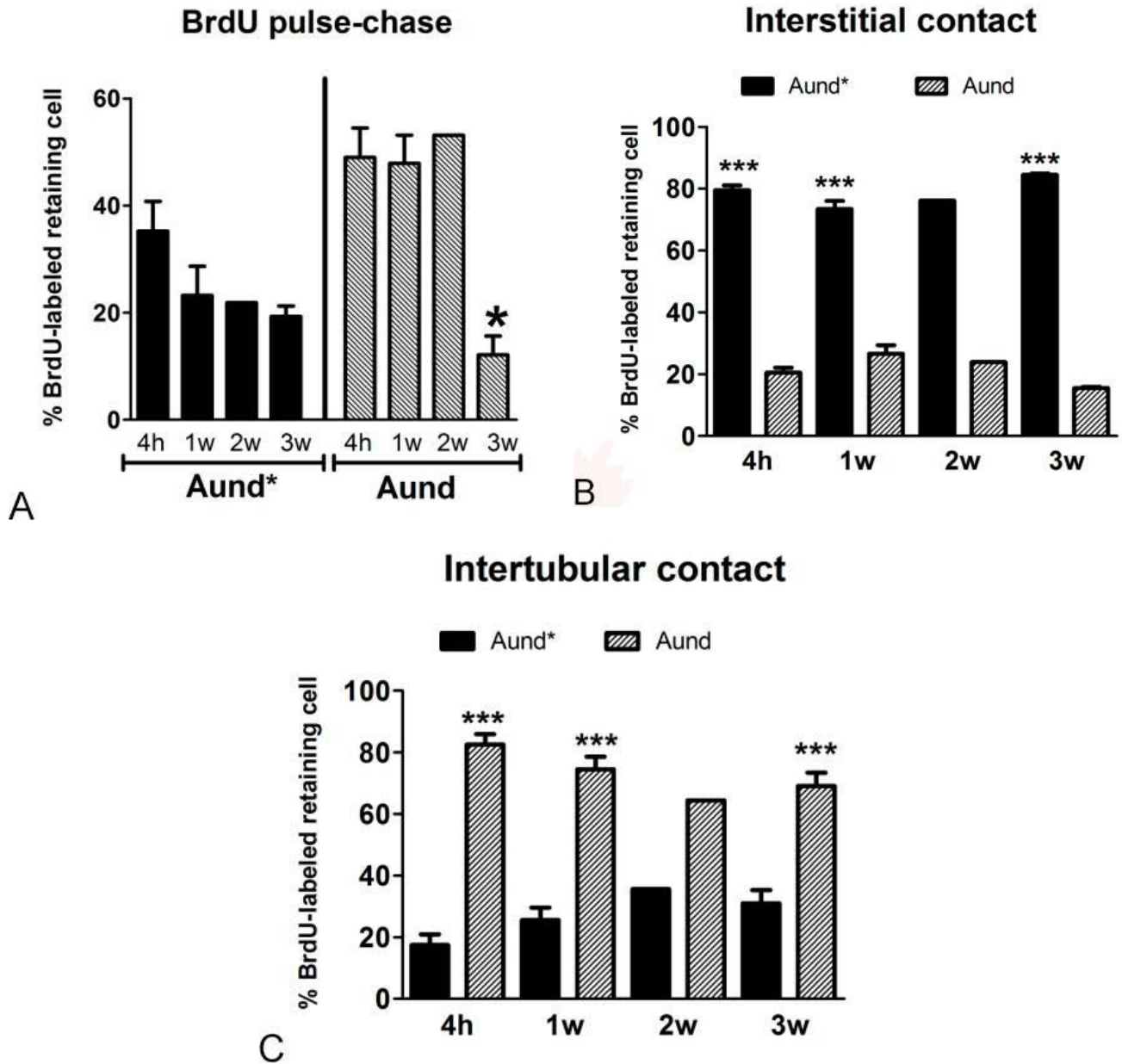


Figura 3. Capacidade de retenção e perda do BrdU pelas espermatogônias Aund* e Aund em carpa comum. **(A):** Porcentagem das espermatogônias Aund* e Aund após 4h, 1, 2, 3 semanas (w) após o último pulso de BrdU; **(B):** Distribuição das Aund* e Aund BrdU-positivas após 4h, 1w, 2w e 3w do último pulso de BrdU na região intertubular. **(C):** Distribuição das Aund* e Aund BrdU-positivas após 4h, 1w, 2w e 3w do último pulso de BrdU na região intersticial. Barras representam as médias ± EP que são expressas em porcentagem e os asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os períodos, e entre os tipos celulares em cada período.

Células Somáticas

Interessantemente, as células somáticas (Sertoli e Leydig) também retiveram BrdU ao longo de todo período avaliado pós-pulso (Figura 4). A porcentagem de células de Sertoli BrdU-positivas diminuiu lentamente e significativamente (3 semanas) durante o período de tempo analisado (4h, 1w, 2w e 3w) (Figura 5). Após 3 semanas, em torno de 10% de células de Sertoli mantiveram positivas ao BrdU (Figura 5). Isso sugere a existência de células de Sertoli progenitoras, possíveis candidatas a células tronco. Em relação as células de Leydig, não houve diferença na perda de BrdU durante o período analisado (Figura 5). Isto pode ter ocorrido devido a este tipo celular apresentar ciclo celular longo com baixa capacidade de divisão celular. A presença de células de Leydig que retiveram BrdU após longo período pós-pulso também sugerem que dentro da população das células de Leydig, existem elementos tronco.

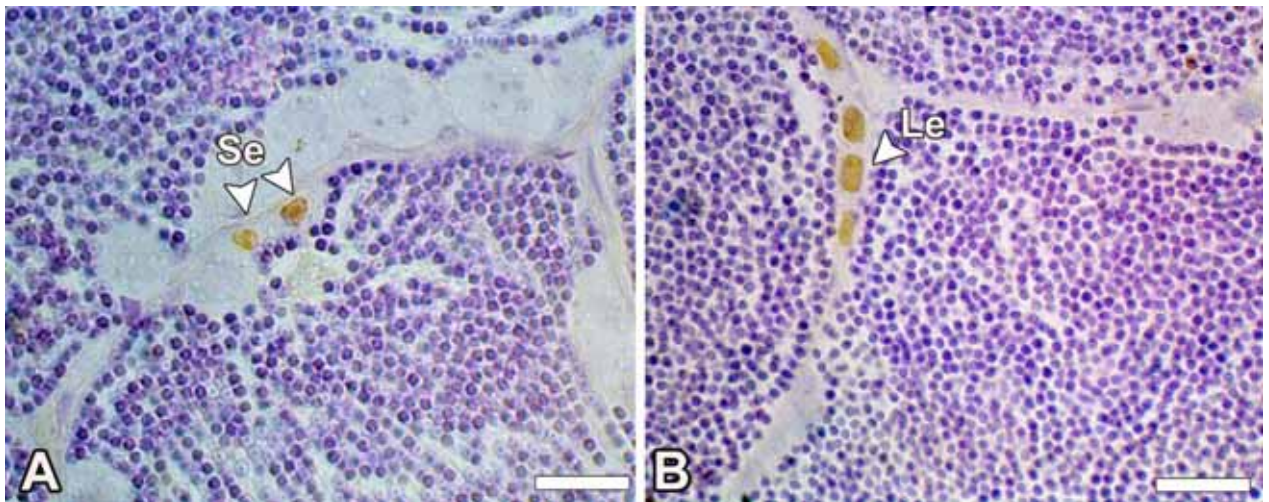


Figura 4. Imunodeteção das células de Sertoli e Leydig BrdU-positivas. **(A):** células de Sertoli BrdU-positivas (Se – cabeça de seta); **(B):** células de Leydig BrdU-positivas (Le – cabeça de seta). Barras de escala: 50 µm.

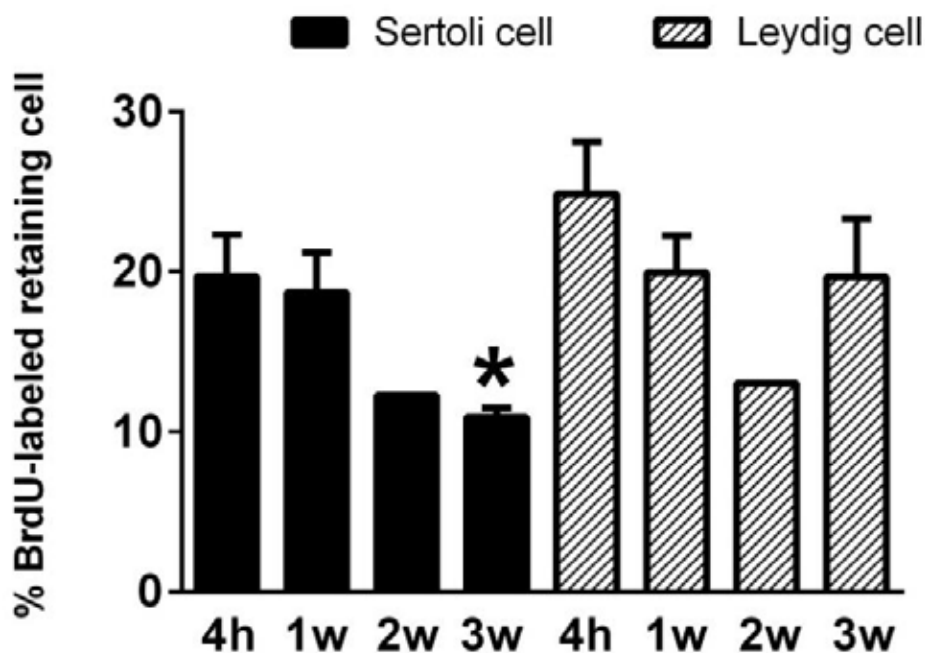


Figura 5. Porcentagem das células de Sertoli e de Leydig que retiveram BrdU após 4h, 1w, 2w e 3w do último pulso de BrdU. Barras representam a média \pm EP ; e o asterisco indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre os períodos.

Em relação às células de Sertoli BrdU-positivas ao longo do período avaliado (4h, 1w, 2w e 3w), em torno de 30-40 % encontram-se livres (definidas aqui como “alone” ou “free”), ou seja, não estão associadas com nenhum tipo de célula germinativa (Figuras 6A, 7A,8C,D,F). O restante, em torno de 60-70 % das células de Sertoli BrdU-positivas estão associadas com um tipo de célula germinativa (Figuras 6B,7B,8A,B,E). Neste sentido, a porcentagem do tipo de células germinativa associado às células de Sertoli BrdU-positivas também foi avaliada (Figura 7B). Durante o período do experimento, as células de Sertoli BrdU-positivas estão associadas aos cistos de espermatogônias do tipo Aund*, Aund, e espermatócitos (Figura 7B). No entanto, existe uma maior porcentagem das células de Sertoli que retiveram BrdU associadas aos cistos de espermatogônias Aund* (Figura 7B).

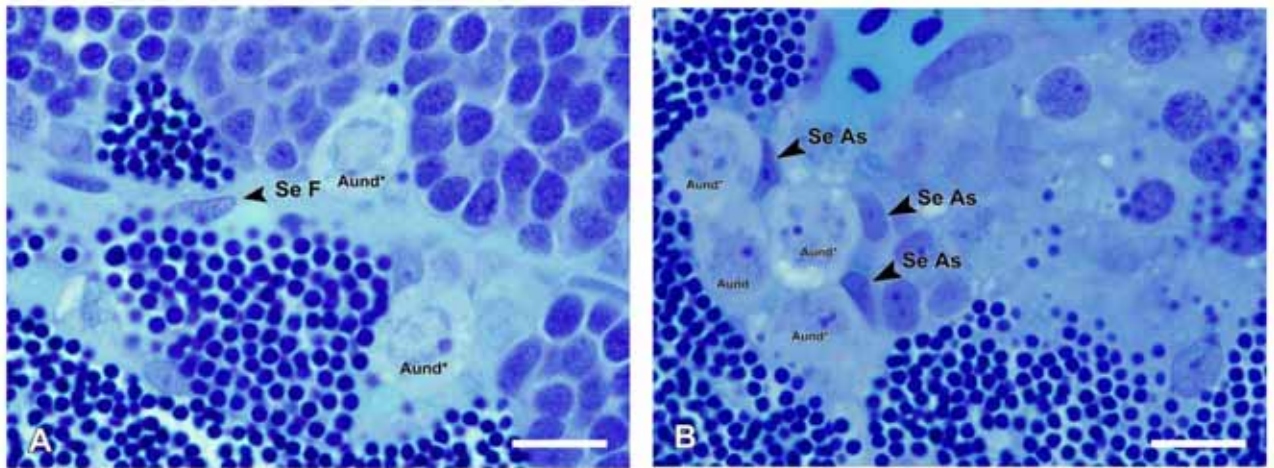


Figura 6. Morfologia testicular de carpa comum em azul de toluidina. **(A):** é possível observar células de Sertoli sozinhas na região intertubular (Se F – cabeça de seta) (sem associação com células germinativas); **(B):** células de Sertoli (Se As – cabeça de seta) associadas com espermatogônias do tipo A indiferenciada (Aund* e Aund). Barras de escala: 100 µm.

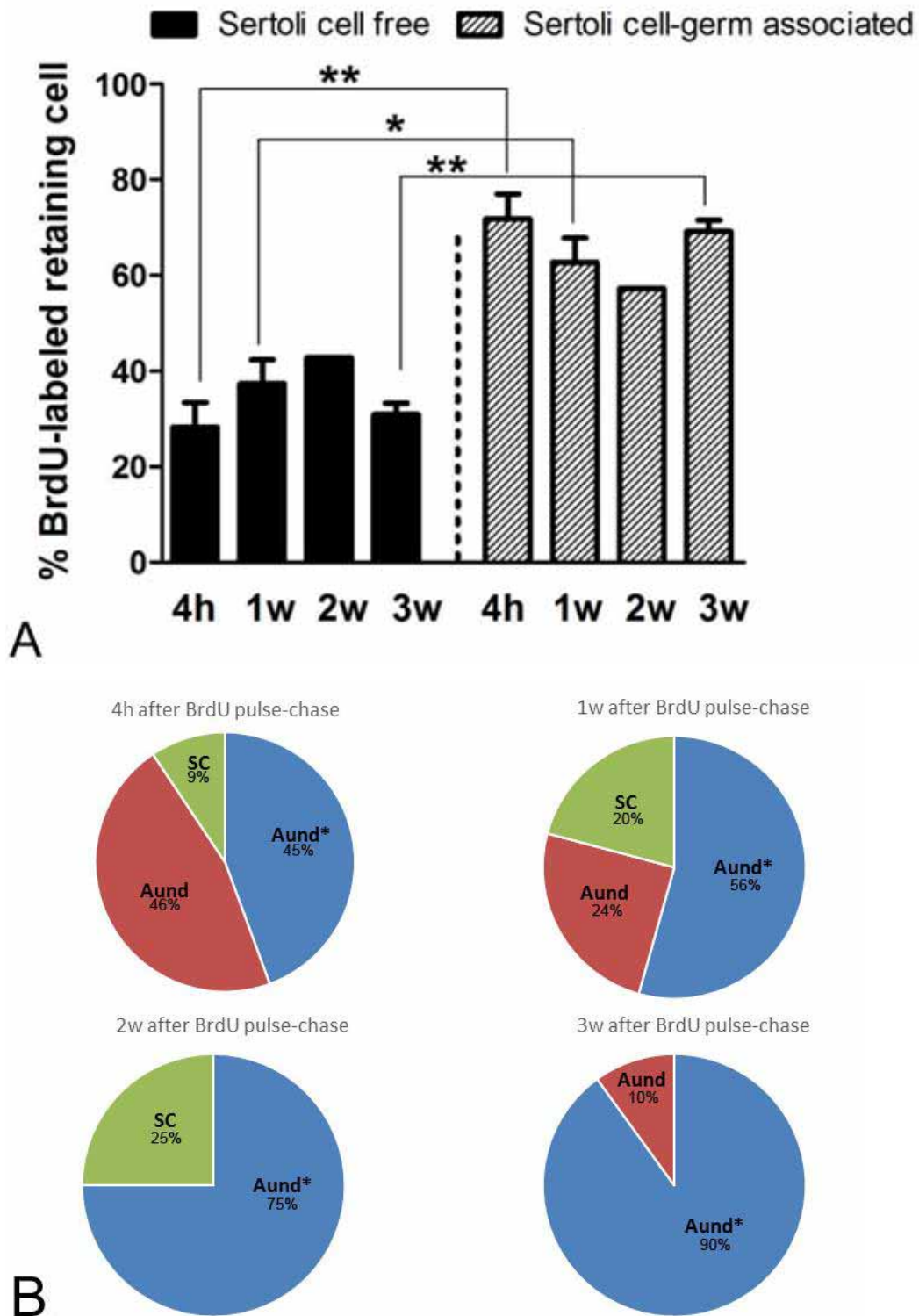


Figura 7. (A): Células de Sertoli BrdU-positivas “free” ou associadas às células germinativas em diferentes tempos após o último pulso de BrdU. (Barras representam as médias ± EP que são expressas em porcentagem e os asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os períodos; **(B):** associação das células de Sertoli que retiveram BrdU com cistos de espermatogônias do tipo A indiferenciadas (Aund*, Aund) e espermatócitos (SC).

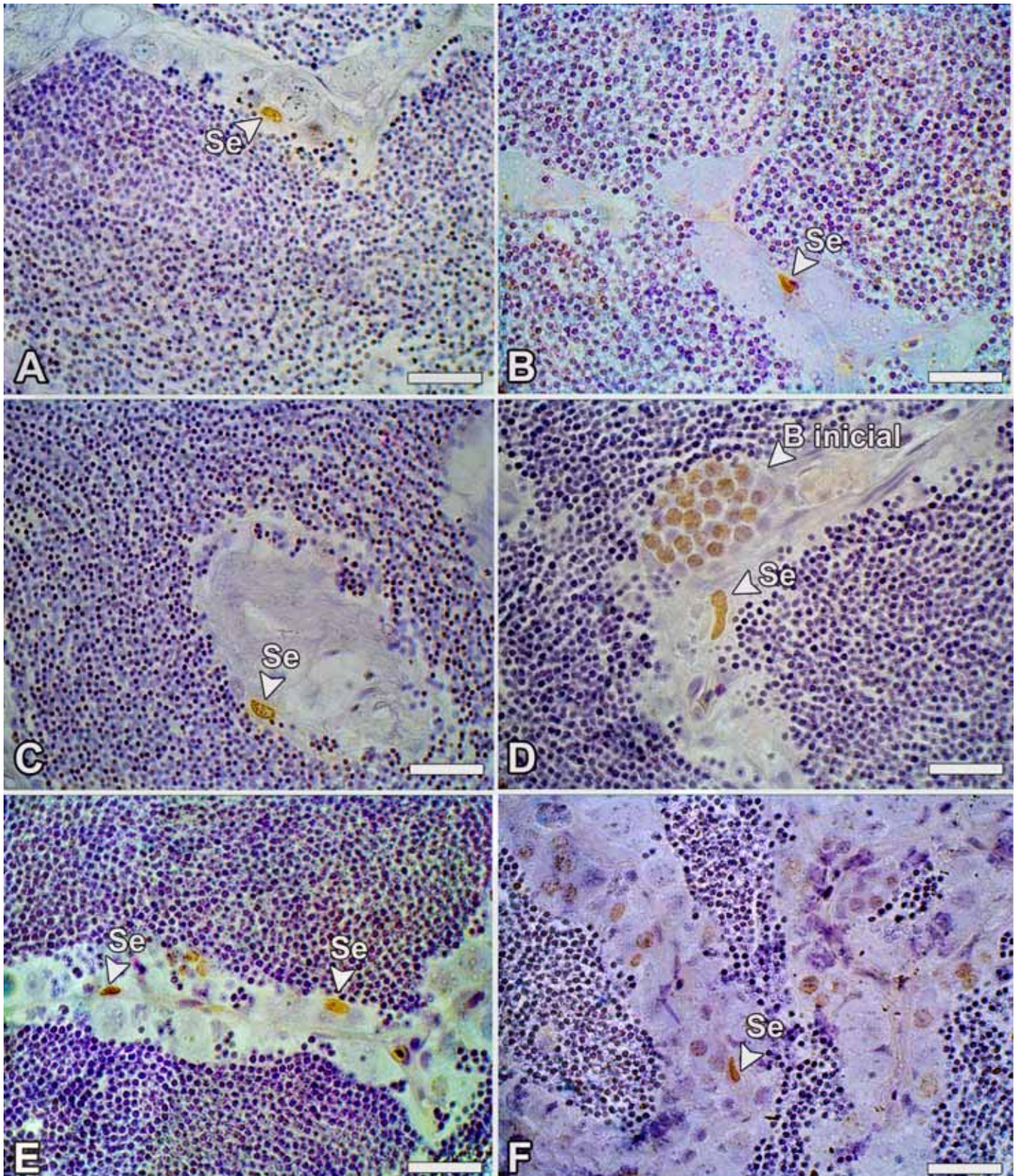


Figura 8. Imunodeteccção das células de Sertoli BrdU-positivas. **(A, B e E)**: células de Sertoli BrdU-positivas (Se) associadas com espermatogônias do tipo A indiferenciadas; **(C)**: células de Sertoli BrdU-positivas sozinhas ("free") ao longo do intertúbulo; **(D e F)**: células de Sertoli BrdU-positivas sozinhas ("free") localizadas próximo a região do interstício. Barras de escala: 50 μm.

Duração da espermatogênese – ADENDO

Com o “pulse-chase” de BrdU, também foi possível estimar a duração da espermatogênese em carpa comum. Esta estimativa se dá através do tipo de célula germinativa mais avançada que reteve BrdU. Assim é possível estimar a duração da espermatogênese a partir da fase meiótica. Quatro horas após o último pulso de BrdU, as células germinativas BrdU-positivas mais avançadas foram as espermatogônias do tipo B final (Figura 9). Também foram encontradas espermatogônias do tipo Aund, diferenciadas (Adiff) e B inicial marcadas (Figura 9). Após 1 semana (1w), os espermátocitos (Figura 9C), espermátides em diferentes estágios (inicial, intermediária e final) (Figuras 9D e 9E) e espermatozoides durante a espermição e também livres no lúmen foram encontrados marcados com BrdU (Figura 9F). Baseados nestas observações podemos estimar que a duração da espermatogênese em carpa comum a partir da fase meiótica é de aproximadamente 1 semana (7 dias).

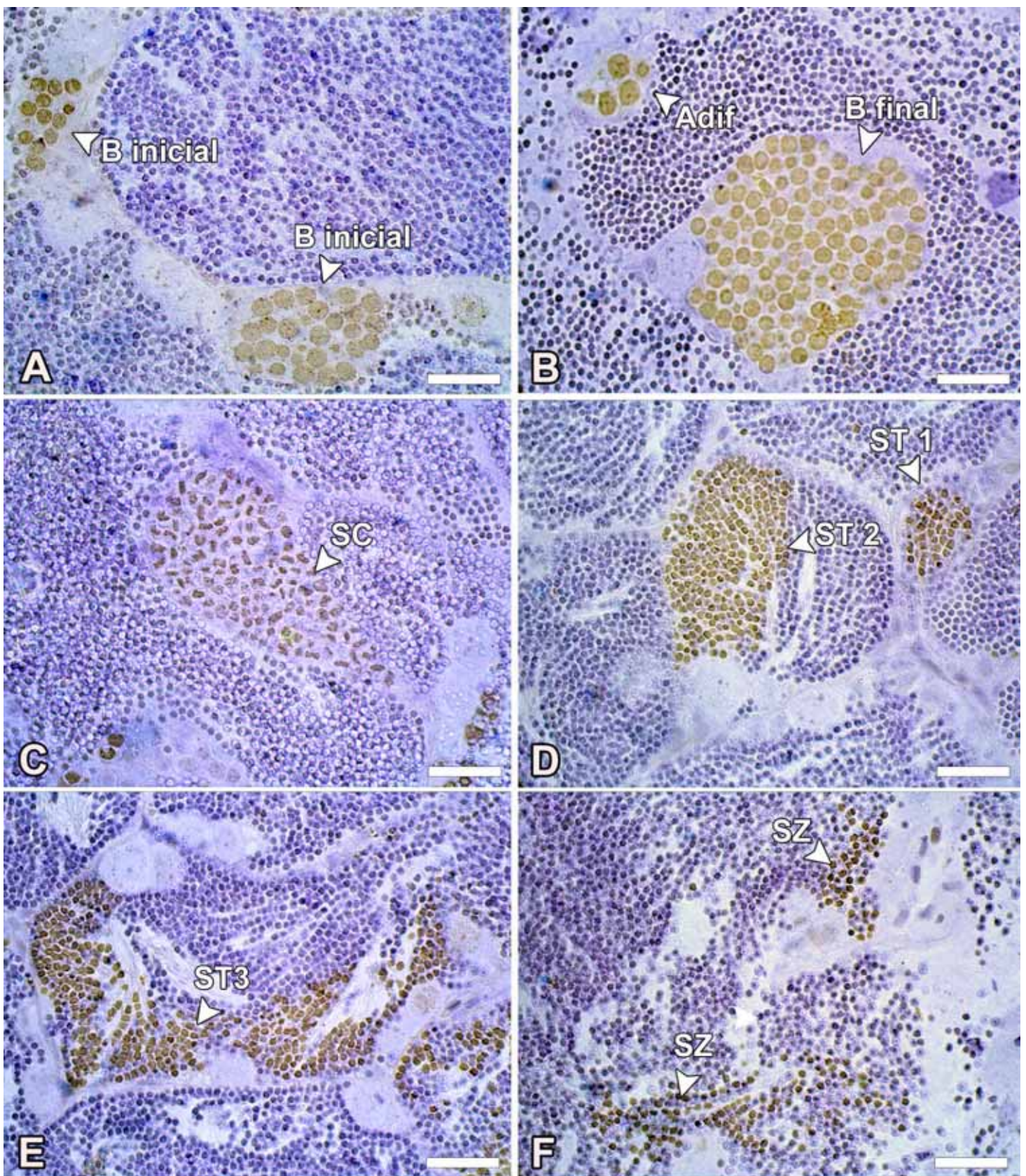


Figura 9. Duração do processo espermatogênico em testículos de carpa comum. As células germinativas mais avançadas que retiveram BrdU: **(A-B)** 4h pós-BrdU é possível observar Aund* (seta), espermatogônias do tipo B

inicial, B final e espermatogônias diferenciadas (Adif); (C-F) 1 semana (w) pós- BrdU, as células mais avançadas que retiveram BrdU foram, espermatogônias do tipo B final, espermatócitos (SC), espermátides inicial (ST1) e intermediárias (ST2) e final (ST3), e espermatozoides no lúmen (SZ). Barras de escala: 50 µm.

Clonagem e caracterização do gene *amh* em carpa comum

Foi obtido uma sequência de cDNA de 1704 pares de bases, o qual codifica uma proteína de 567 aminoácidos, que é altamente homóloga aos outros precursores para Amh. A sequência foi depositada com o número KF640084 no NCBI, como observado abaixo.

>KF640084_carpa comum:

```

ATGCTCTTCCACGCAAGATTTTGGCTAATGCTGTTGCTGATTGTGGCGACTGG
GTCATATGGTGCCAGCGTAGGACACACAGAGCAGGATAACAGCCCGAAGGT
CACCCAATATCAGGATGGAATGGAGATGAGCAGGAAGTTGCAGATATGGTA
CACGTACCCCGAAGTGCCAGTGAACAGCCGATTGGTCCATCAGCCCATTCAA
CACATTCCACTGAAGACGTGCCATGTGATGATGAGCAACTAGCTCACAGTCG
TGCCATGGATGACTTCTGTGAGCCCTGAACATGGAGAGTGAAGTTGGGAGG
ATGGGTTACCAGCAGTTTGGAAAATGTTTCGTCTGGAAGTTTTCAGGTTTGCAGAT
TTCACATCTAGTACAGAGTTTGGACAAAAACGAAGTGGCCTCAAGGGTGTA
CATGCCACAAAAGTAGATATTTGGGATGCTGAGAAGGAAGGAGACACGACTT
TAACCCTCACATTCCCAAGACATGCTCAGCCGAGCAGCCCAGCCTCTGTGAC
GCTCCTGTTTCAGTGTGCGATTCCATTAAGGAGATGGTTTGGGAGTGAAATTCA
ACAGTCATTCCATCCATCCAAATACACAGATGGTTTGCATTTCTGAGGCTACA
CGTTTCTGGTCTTAAAGCAGGACAAAGTCATGCCACGTTTCACCTTAAGCT
AAGTGTAACAATTGAGACATGGAAAGATGAAAACCAGCCGAAACCCAGTGTG
TCTGAGCTTCGGGACGTGTTGATGAGAAAGGTAGACGGCAACAATATGTCAA
TGAAGCCGGTCTTAGTTTTCTCTGACCGTGATGAGCAAAGGACACCGCA
CTTAAAATATCACGAAATCCACTGGATGAGAACTCCCATCCAGAACTTATC
TTTTCTCTGCGAGCTGCAGAAGTTCTTGAGTGACGTCCTTCTCAGAAAGAG
GGGCCGACATCTCAGGAAGGTGCAAACATTGTCTCTTTGGATGCGCTGCATT
CCTTCCACCTCTCAGCCTTGGAGTGTCATCCACAGAGTCCCTGCTATCAGG
GCTGGTGAATTCCTCCACGCCGACTGTATTTGTCTTCCCTGAGAGGCAGCAA
GGCCTGCAGACTCACAGAGTGGAGGTGACACTAGATTCTCCTCTGTTGTCTG
TGCTCAGAATGAGACTGGATGAAGCCATGGCTCAGGTGAAACAGCAGGAGG
TGGGGCAAAGGTGACTGACAGGCTTCAGAACTGAGTGAAGTAAAGTGCCTT
TTCTCCAGAAGGAGAGGACGAGGAAGCAGTCGCTAAGGAACATAAACGGGC
CCAATACCGGTCCGTTTTGCTGCTCAAGGCCCTGCAGGTGGTACTCAGTACC
TGGGAGGTGGAAAGAGCTCAGAGAGCAGTCAGAGCGGATGAAGATGGCCCA
TCAGTGCCAGTCAGTGTGCGCTTCAGAGCTTGTCCGTGTCCTTGAGGAAGT
TCTTTCTGAGCCCTCTAAAGTCAACATCAACAACGTGAGGGAGAGTGTGG
ATTCCCCCTGACCAGCGGCAACAACCAGCCATCCTCCTGAACAGCCATATT
CAGAGCGGCCAGCCCGTCAATCGCTCTCTGCTGCGTACCGGTGGAATTTG
ATGACCTGTGTGTGATCGAGCTTGAGAGCGAGGGCACTAACATCTCCTTCAA
GACCAATGTGGTAGCGACCAAGTGTGAATGTCGCTGA

```

A sequência de aminoácidos

A sequência obtida foi comparada com outras sequências e os domínios da proteína determinados (Figura 10). Através do programa Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) foi verificado exatamente onde começa e termina cada domínio. O domínio de AMH-N vai do aminoácido 87 até 457 (marcado em amarelo na Figura 10A, ou indicado na caixa vermelha na Figura 10B), e o domínio TGF- β vai de 473 até o 567 (marcado em verde Figura 10A ou indicado na caixa azul da Figura 9B).

A

MLFHARFWLMLLLIVATGSYGASVGHTEQDNSPKVTQLSGWNGDEQEVA DMVHVPRASEQPIGPSAHSTHSTE
 DVPCDDEQLAHSRAMDDFLSALNMESELGRMGYQQFGKCSSGTSGLQISHLVQSLDKKRSGLKGVHATKVDIW
 DAEKEGDTTLTLPFPRHAQPSSPASVTLVSVDSIKGDGLGVKFNHSIHPNTQMVCISEATRFLVLKAGQSHAHV
 HLKLSVTIETWKDENQPKPSVSELRDVLMRKVDGNNMSMKPVLVFLSDRDEQRTPHLKYHGNPLDEKLPSRTYL
 FLCELQKFLSDVLPQKEGPTSQEGANIVSLDALHSLPLSLGVSSTESLLSGLVNSSTPTVVFVPERQQGLQTHR
 EVTLDSPLLSVLRMRLDEAMAQVKQEVGQKVTDRQLKLSALSPEGEDEEAVAKEHKRAQYRSVLLKALQ
 VVLSTWEVERAQRVRADEDGSPVPSQCRLQSLVSLRKFPEPSKVNINNCEGECGFPLTSGNNHAILNSHIQ
 SGQPVNRSLLCCVPVEFDDLCVIELESEGTNISFKTNVVATKCECR

B

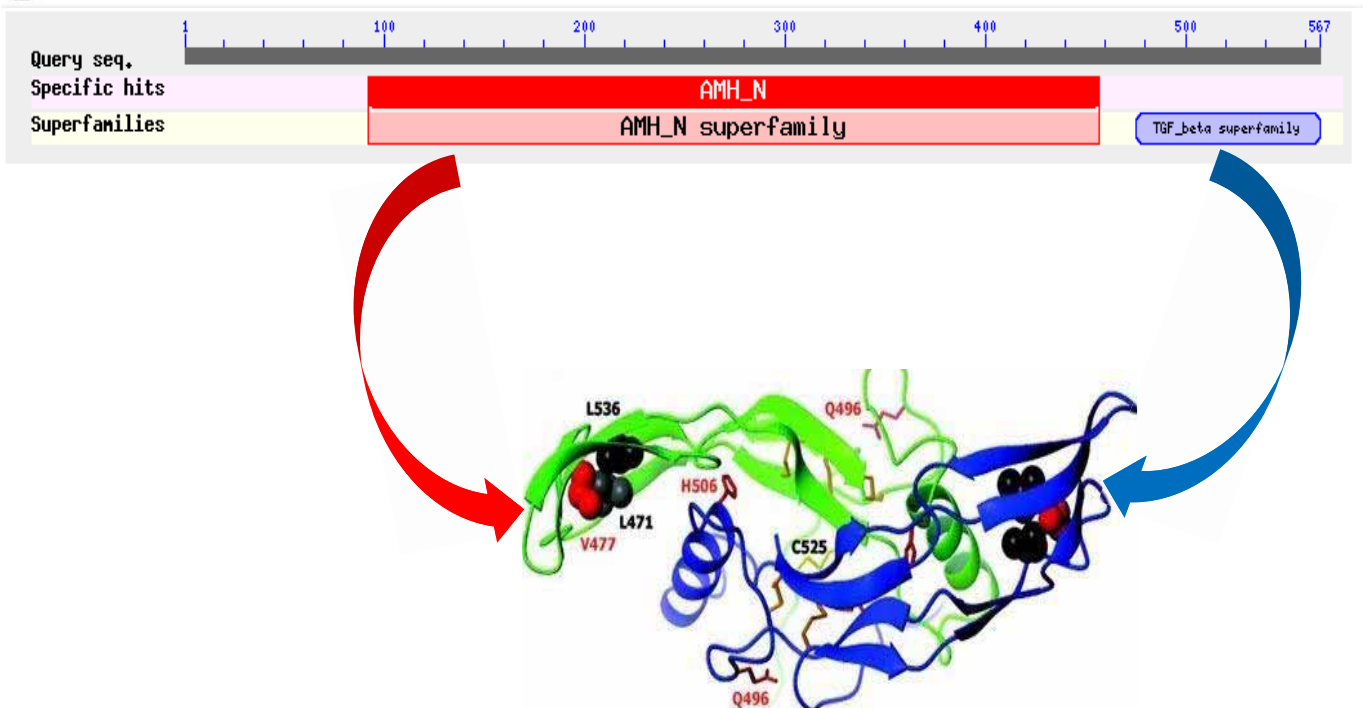


Figura 10. Sequência de aminoácidos para a proteína do Amh da carpa comum, onde (A) em amarelo corresponde a região do domínio AMH_N (aminoácido 87 até 457) e marcado em verde corresponde ao domínio TGF- β (aminoácido 473 até o 567); (B). Domínios putativos do Amh de carpa comum. Caixa vermelha indica o domínio AMH_N, bem como a região mostrada em verde na proteína (figura tridimensional) e caixa em azul, indica o domínio TGF- β , assim como em azul na proteína (figura tridimensional).

Comparação de domínios proteicos do Amh e análise evolutiva

A Figura 11 abaixo ilustra a comparação entre os domínios AMH_N (caixa preta) e TGF- β (caixa vermelha) em diversos vertebrados, incluindo peixes. Interessantemente, o domínio AMH_N é bastante diverso entre as espécies, enquanto que o domínio TGF- β parece ser mais conservado, conforme mostram os asteriscos na Figura 11.

M-----GDEQEVADWVHVRFSASEQIFGSA-----67
 N-----GGEQEVADWVHVRFSASELIGPSA-----64
 N-----GDQLEVDLACYHRQQP-----59
 N-----GDQP-----41
 -----IGFA-----5
 -----ALIVSRHS-----27
 -----EYSLPAAKTFPSFS-----42
 GD-----KSSWEVKGGENALIVVEIINSHF-----24
 -----VQHHSTG-----74
 EDGANGSERENEDFRSRSDDAEADQNSTARDDEFEF-----88
 TR-----GLIFLEDELWPFSPFELCLIVTIVAGEG-----61
 IS-----GLIFEDLDWPPGIPQFELCLIVALGGDS-----63
 AMRNVSRARFGLAVRATASRLLEFFAASCTIQDGSLSLQFNWFLGGIE 94

KF640084_Cyprinus_carpio 41
 JX413514_Carassius_auratus_esp 38
 AAX81416_Danio_reio 41
 EUI36185_Squalius_pyrenaicus 31
 EUI36186_Squalius_alburnoides 41
 AB166791_Paralichthys_olivaceu 19
 DQ257618_Oreochromis_aureus 27
 AB166790_Oryzias_latipes 16
 NM_001123585_Salmo_salar 16
 AB074569_Anguilla_japonica 47
 NM_007445_Mus_musculus 31
 K03474_Human 33
 X89248_Gallus_gallus 44

QDFGKSSGTSGLQ-----ISHLYQSLDK-KRSGLKGVHATKVDWDSEK 151
 VG-----VSHLYQSVLQ-KQSLKGVHAT-EDIWDADN 136
 OHFGICSPSPGLQ-----VSRLYQVQO-NRNLKGVHAT-KDWDDEQ 122
 OHFGICSPAPGLQ-----VSRLYQVQO-NRNLKGVHAT-KDWDDEQ 86
 ALFEGCAVSDSSG-----SVLLEAKETSQRKGLVHFTVIGVTEEDD 104
 VLFGCSQARSSA-----SVLDLANKS-----SLEVLHAAVHVSEEE 119
 IIFGAKRADDPSR-----SILVLSERRRMPDGLKVRGPAVFAEE-----101
 TRFGARSDDGAFI-----PALSTAEAKK-EKGLHWHFTKELAESEVE 164
 TRFGICSDDGHNSTGNALSAKAGVEK-DRGLHWHFTKELAGAGE 181
 ATFGVST-DSQALP-----ALQRLANWGETGE-QQLIVLHAEVIV 137
 ATFGVNTGRQALP-----SLARLGNLWDFEG-QQLIVLHAEVIV 140
 ETEFLGFGDAQVLR-----FLQQLQEHLAGEMGLQRFILHLHLEEVKN 183

KF640084_Cyprinus_carpio 107
 JX413514_Carassius_auratus_esp 99
 AAX81416_Danio_reio 95
 EUI36185_Squalius_pyrenaicus 79
 EUI36186_Squalius_alburnoides 43
 AB166791_Paralichthys_olivaceu 57
 DQ257618_Oreochromis_aureus 77
 AB166790_Oryzias_latipes 56
 NM_001123585_Salmo_salar 118
 AB074569_Anguilla_japonica 132
 NM_007445_Mus_musculus 95
 K03474_Human 97
 X89248_Gallus_gallus 138

HSIHPTQWYVICISEARFVILKAGQSHARVHLK-----LSVTIET 233
 QSIHPTQWYVICISEARFVILKAGQSHARVHLK-----LKTIVET 218
 HSIQPTQWYVICISEARFVILKAGQSHARVHLK-----LSVTVEA 204
 HSIQPTQWYVICISEARFVILKAGQSHARVHLK-----LSVTVEA 188
 LSLQPTQWYVICISEARFVILKAGQSHARVHLK-----WRISVEA 185
 QFLPNTQWYVICISGDQVLLTGRKSEGVDR-----QWIIAQI 200
 RFLPFSQACISEGILYVLMGRSSSSSQHR-----WIIAEQ 183
 HSIQPTQWYVICISEGTFQVLLTGRKSEGVDR-----WRFNVDI 245
 FSLPHEQVLCISAGKAVILRQTKRSHHGQGGQGGVWVRIVEA 278
 GIGLQKQVLCIFRDKRYVILVDFPAGAWSS-----GLIILIQ 214
 RAGPQASLCPKRDYRIVLAVDPAWGRS-----GLIILIQ 217
 GTGLTQKQSLCFRDKRYVILVAVDPAWGRS-----FQLSIIR 276

EGDITLITFRRAQFSSPA-----SVILLFVDSIKG-----DGLGVZFN 193
 EGGITLITFRKSLRAGEA-----SVMLLFVNFKG-----DGLRVQFN 178
 EGGITLITFRRAQFNPA-----SVILLFVDSIKG-----DGLRVFN 164
 EGGITLITFRRAQFNPA-----SVILLFVDSIKG-----DGLRVFN 128
 RGAELIFDLPQPLRLNS-----VILLAVFSPKIG-----DGLRVFN 145
 QGIIIFDLPQPLRLNS-----VILLAVFSPKIG-----DGLRVFN 160
 RGVILTFDLPQPLRLNS-----VILLAVFSPKIG-----DGLRVFN 143
 GGGVILHLFRPPLSNLK-----VILLAVFSPKIG-----DGLRVFN 205
 HQRRELIRLLEPFFHARLGLAVIVFALGGTASTI-----GGRVVFGS 228
 EPELILQKQVLCIFRDKRYVILVDFPAGAWSS-----QVTVI 174
 EPELILQKQVLCIFRDKRYVILVDFPAGAWSS-----QVTVI 177
 EAQPLRFRUFFRFAEVGRLLGE-LHVALLLVFGSFTGRNAEGRQELLEIVE 232

KF640084_Cyprinus_carpio 193
 JX413514_Carassius_auratus_esp 178
 EUI36185_Squalius_pyrenaicus 164
 EUI36186_Squalius_alburnoides 128
 AB166791_Paralichthys_olivaceu 145
 DQ257618_Oreochromis_aureus 160
 AB166790_Oryzias_latipes 143
 NM_001123585_Salmo_salar 205
 AB074569_Anguilla_japonica 228
 NM_007445_Mus_musculus 174
 K03474_Human 177
 X89248_Gallus_gallus 232



Figura 11. Comparação das sequências de aminoácidos do gene *amh* entre várias espécies. O alinhamento foi realizado utilizando o Clustalw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Asterisco (*) indica os sítios conservados dos aminoácidos. Caixa preta indicando o domínio AMH-N e caixa vermelha indicando o domínio TGF-β da proteína.

As análises evolutivas do gene *amh* demonstram a proximidade filogenética entre as espécies da ordem Cypriniformes, onde é possível perceber a proximidade filogenética entre *Cyprinus carpio* e *Danio rerio* (Figura 12).

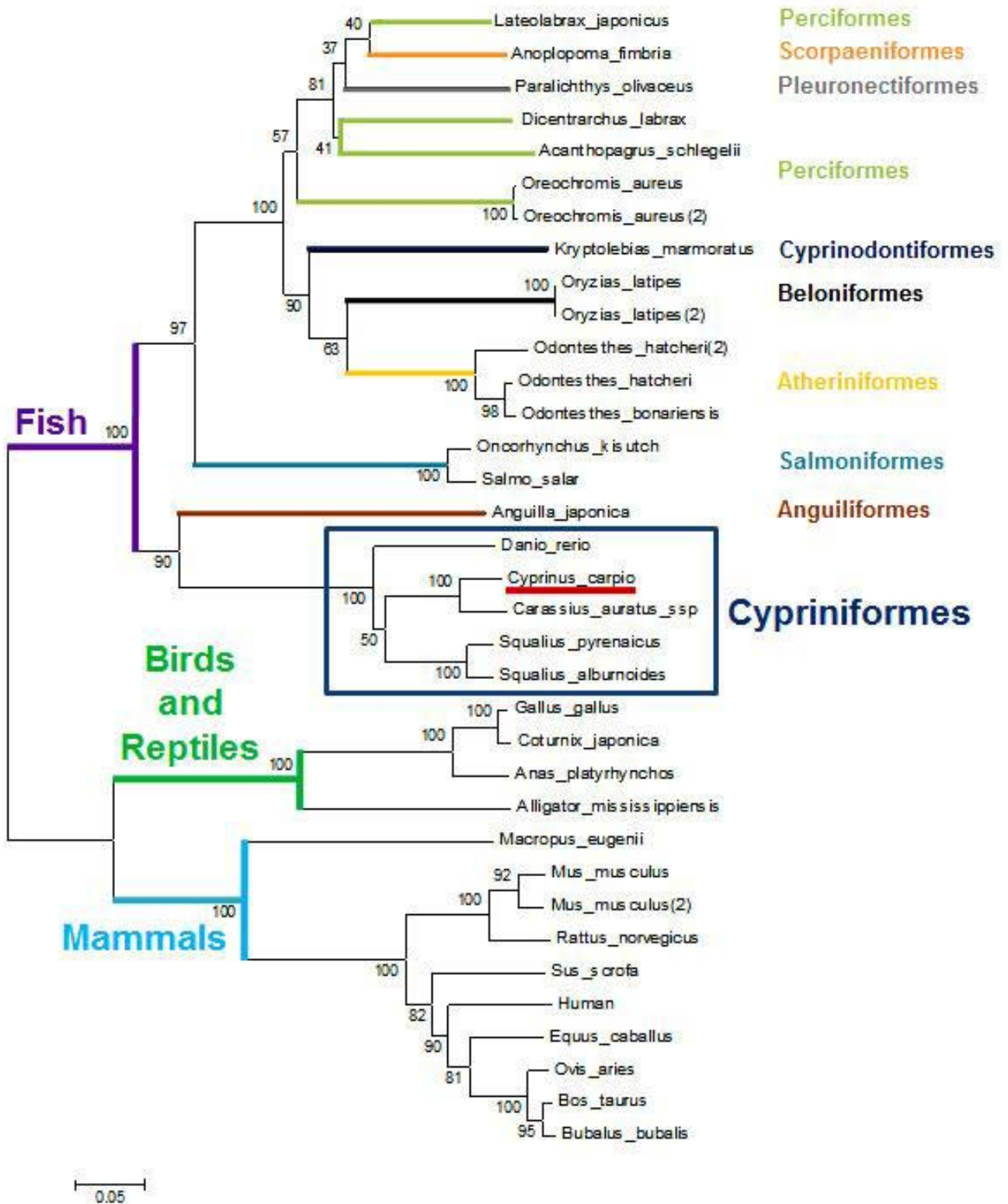


Figura 12. Análises evolutivas do *amh* pelo método de distância filogenética, Neighbour joining (NJ). Uma busca heurística foi utilizada com 1000 réplicas de *bootstrap* (O número indicado acima do ramo, mostrando a sustentação estatística da relação, 50 > ou = indicando um bom suporte). É possível ver a proximidade filogenética do gene *amh* entre *Cyprinus carpio* (carpa comum), *Carassius auratus* (goldfish) e *Danio rerio* (zebrafish).

Expressão do *amh* em diferentes tecidos

A expressão do *amh* em diferentes tecidos/órgãos (cérebro, brânquias, coração, fígado, músculo, intestino, olhos, testículos e ovários) foi avaliada por *qPCR* (Figura 13A) e também por RT-PCR (Figura 13B), em ambos os sexos. Os resultados mostraram que o *amh* é expresso apenas nas gônadas, sendo mais expresso nos testículos do que ovários (Figura 13). É possível notar expressão no cérebro de fêmeas e também no músculo de machos observados por *qPCR* (Figura 13A), porém, em valores insignificantes, quase imperceptíveis em RT-PCR (Figura 13B).

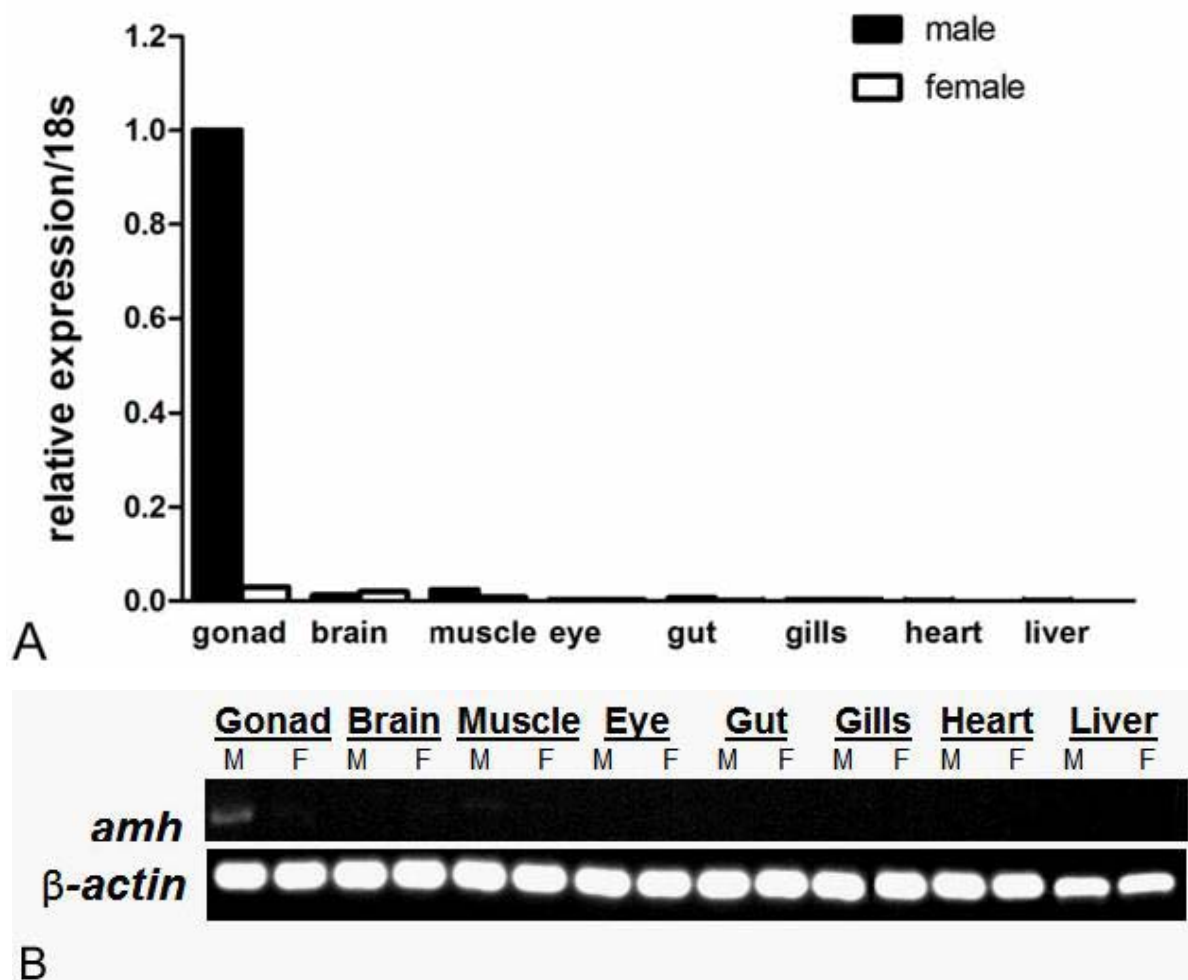


Figura 13. Expressão do gene *amh* em diversos tecidos/órgãos de carpa comum sexualmente madura. **(A):** Expressão do gene *amh* por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para ambos os sexos. A expressão foi avaliada nas gônadas (testículo e ovário), cérebro, músculo, olhos, intestino, brânquias, coração e fígado. A expressão foi normalizada pelo gene de referência *18S* e os expressos em relação aos níveis de *amh* no testículo. **(B):** Expressão do *amh* por RT-PCR para os mesmos tecidos/órgãos em ambos os sexos. **M** indica macho, **F** fêmea.

Hibridização *in situ*

Com a hibridização *in situ* foi possível localizar os sítios de expressão do *amh* em testículos de carpa comum sexualmente madura (Figura 14). O *amh* é expresso nas células de Sertoli, que estão envolvendo as espermatogônias do tipo A indiferenciadas (Aund) (Figuras 14B,D,F).

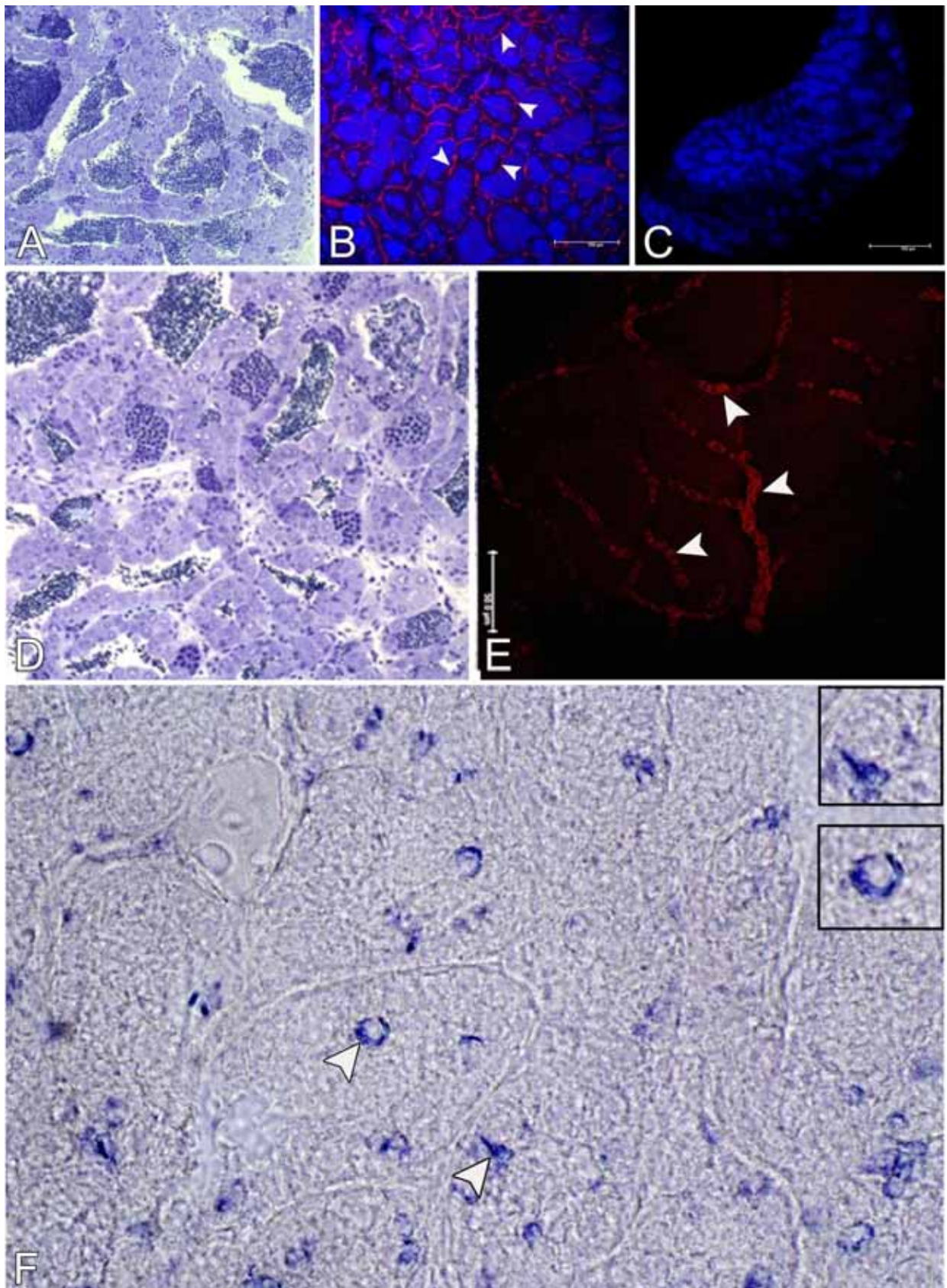


Figura 14. Hibridização *in situ* indicando o sítio de expressão do gene *amh* no testículo de carpa comum sexualmente madura. Note que a marcações estão nas regiões que circundam as espermatogônias e também em outros tipos de células germinativas. **(A-C):** testículo com alta expressão de *amh*. **(A e D):** corte morfológico

corado com azul de toluidina, no aumento de 20 X; **(B e E)**: *probe* senso (T7) no aumento de 20 e 63 X respectivamente. Marcações em vermelho indicadas pelas cabeça de seta estão mostrando os sítios de expressão do *amh* nos cordões que são formados por espermatogônias; **(C)** *probe* antisenso (T3) no aumento de 20 X; **(F)**: Localização presuntiva do *amh*. Cabeça de seta indica sinais positivos do *amh* e sua localização presuntiva nas células de Sertoli (inset).

Controle endócrino

Explantos testiculares de carpa comum no mesmo estágio do ciclo reprodutivo (regressão/regredido com grande quantidade de espermatogônias) foram cultivados com diferentes concentrações de β -estradiol (E2) (10nM, 100nM e 1 μ M) (Figura 15A,B) e com recombinante do hormônio folículo estimulante de zebrafish (rzf Fsh) (50, 100, 500 e 1000 ng/ml) (Figura 15C,D) para avaliar o efeito destes hormônios na expressão do *amh* da carpa. Após 18h de cultivo, a expressão do *amh* em ambos tratamentos não foi alterada (Figuras 15A,B). No entanto, após 7 dias de cultivo, foi possível observar alterações significativas sobre a expressão do *amh*. Para inibir significativamente a expressão gênica do *amh in vitro*, doses de 10nM de E2 (Figura 15B), e 50 e 100 ng/ml de rzf Fsh (Figura 15D), foram suficientes. Doses de E2 (1 μ M e 100nM) (Figura 15B) e doses maiores de rzf Fsh (500 e 1000 ng/ml) (Figura 15D), não causaram efeito na expressão do *amh* em relação ao controle. Estes resultados mostram que tanto o Fsh como o E2 atuam inibindo a expressão do *amh*.

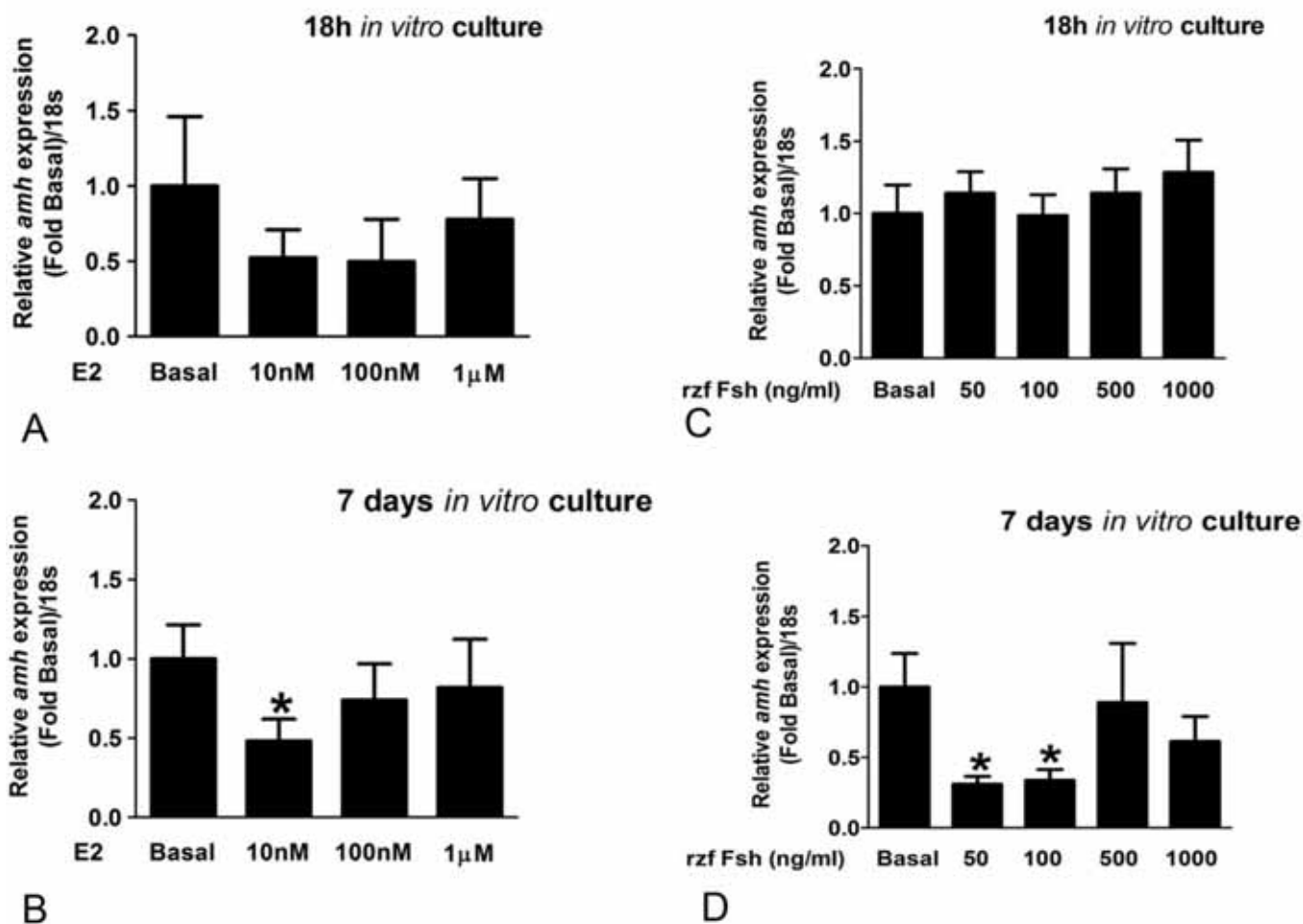


Figura 15. Expressão do gene *amh* em cultura de testículos de carpa comum de um mesmo estágio reprodutivo (regressão/regredido). **(A)**: testículos tratados com β -estradiol (E2) durante 18 horas e **(B)** 7 dias; **(C)**: testículos tratados com rzf Fsh durante 18 horas e **(D)** 7 dias. Barras representam as médias \pm EP da expressão relativa do gene em relação ao controle (fold induction), onde 1 é basal, >1 estimulação, <1 inibição. Asteriscos indicam diferença significativa ($p<0.05$).

Expressão do gene *amh* versus proliferação celular (PCNA)

De acordo com análises histológicas, os testículos foram agrupados em dois estágios (Figura 16): um com espermatogônias principalmente (Figura 16A,B), e outro no início da maturação, onde observam-se cistos de espermatogônias do tipo B e espermatócitos (Figura 16C,D). Nestes, a expressão do *amh* foi determinada por qPCR (Figura 17). Nos testículos com predominância de espermatogônias, a expressão do *amh* encontra-se elevada (Figura 17). Com o início da maturação, a expressão do *amh* diminui significativamente (Figura 17). Nestes mesmos testículos, a imunohistoquímica para PCNA, que é um marcador

de proliferação celular, foi realizada no intuito de avaliar a proliferação celular nestes estágios. Para tanto foi determinada a porcentagem de células PCNA-positivas para espermatogônias indiferenciadas (Aund), células de Sertoli e células de Leydig. Interessantemente, os testículos com maior atividade proliferativa tanto para espermatogônias indiferenciadas como para células de Sertoli apresentaram baixa expressão para o *amh* (Figura 17). Por outro lado, os testículos com baixa atividade proliferativa tiveram os maiores níveis de expressão do *amh* (Figura 17). Em relação às células de Leydig, não é possível observar diferença entre os diferentes padrões de expressão do *amh* (alto ou baixo) (Figura 17).

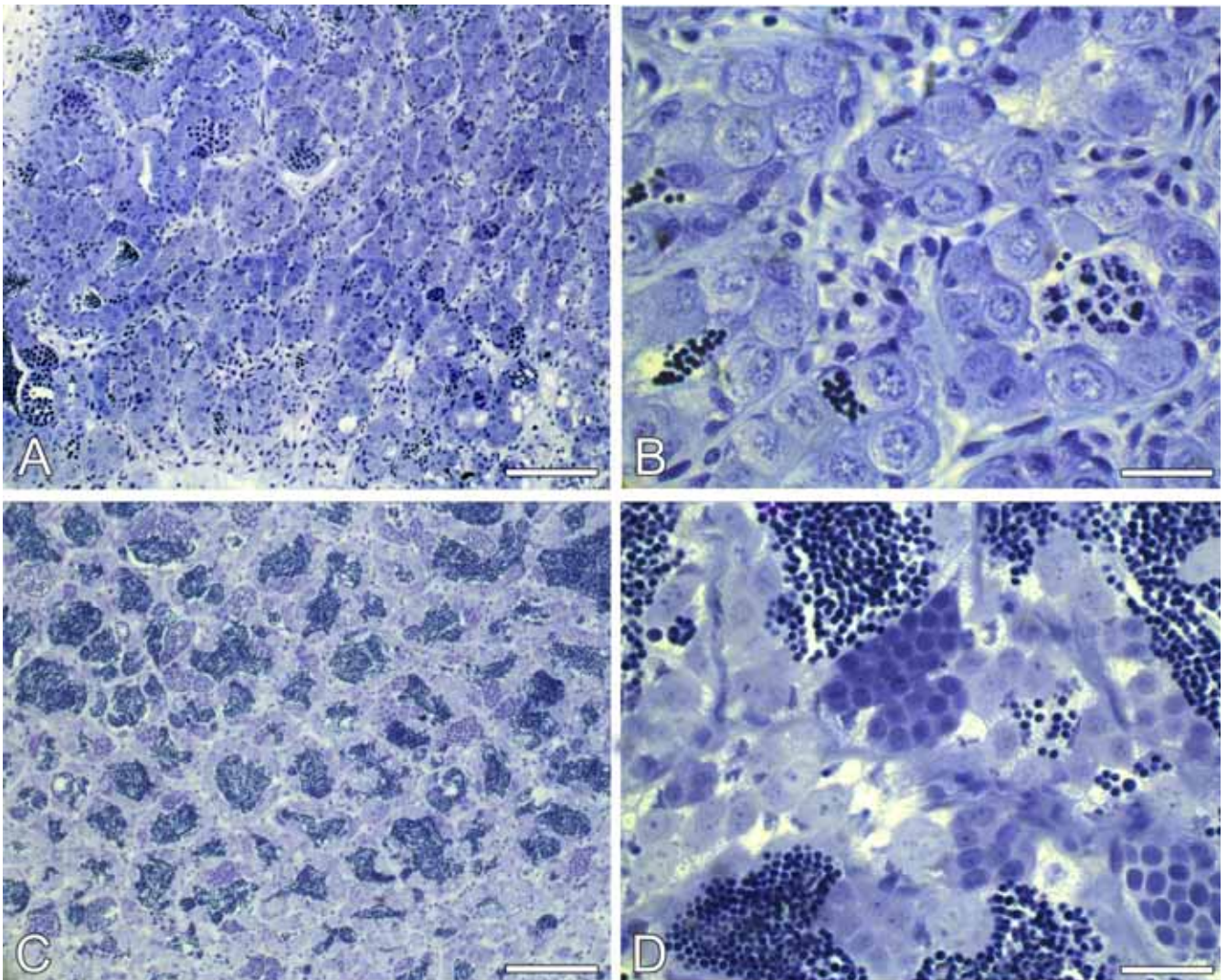


Figura 16. Morfologia dos testículos de carpa comum corados em azul de toluidina. **(A e B):** Expressão do *amh* alta, **(A)** onde é possível observar grande número de células somáticas e germinativas. **(B)** é possível observar espermatogônias do tipo A indiferenciadas quiescentes. **(C e D):** Nível de expressão baixado *amh*. **(C):**

Presença de células germinativas em proliferação e diferenciação; (D): é possível perceber espermatogônias diferenciadas e do tipo B. Barras de escala: 50 μ m

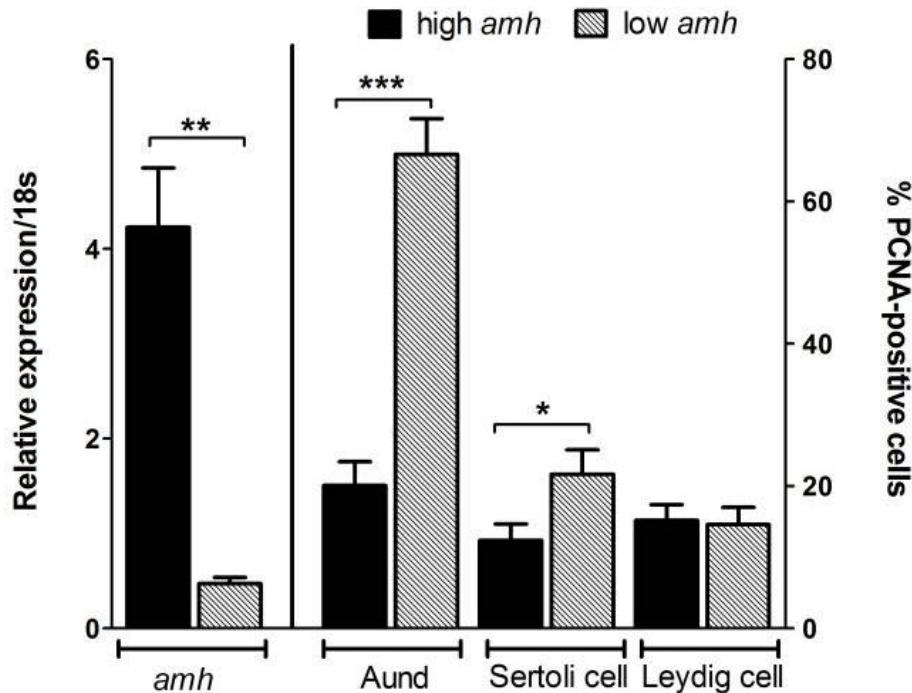


Figura 17. Expressão do gene *amh* e sua correlação com a atividade proliferativa das espermatogônias do tipo A indiferenciado (Aund), células de Sertoli e células de Leydig. Dois grupos foram definidos; um de alta expressão (testículos cheios de espermatogônias), e outro de baixa expressão (testículos no início da maturação) do *amh*. Barras representam as médias \pm EP. No caso da expressão, os valores foram normalizados com a expressão do *18S* e expressos como valores relativos à média de todos os animais. No caso da proliferação celular, os valores estão expressos como porcentagem das células PCNA-positivas para cada tipo celular. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

Discussão

Caracterização do nicho espermatogonial: espermatogônias tronco (Aund* e Aund) e precursores de células de Sertoli (células de Sertoli tronco)

Através de experimentos de “pulse-chase” com BrdU, foi possível caracterizar o nicho espermatogonial, assim como identificar as candidatas às células tronco tanto da linhagem germinativa como da somática.

Dois tipos de espermatogônias do tipo A indiferenciado (Aund* e Aund) foram encontradas nos testículos de carpa comum à semelhança de zebrafish, *Danio rerio* (LEAL *et al.*, 2009; NÓBREGA *et al.*, 2010). As espermatogônias do tipo Aund* são volumosas, claras e núcleo com formato irregular, enquanto que

as do tipo Aund são menores, mais escuras e núcleo arredondado. Ambas células retiveram BrdU por um longo período após o último pulso (3 semanas), sugerindo potenciais candidatas às células tronco. Isto se justifica pela quiescência e longo ciclo celular que caracterizam as células tronco em geral (NÓBREGA *et al.*, 2010). Quanto à cinética do ciclo celular, o BrdU dilui-se rapidamente entre as células-filhas das espermatogônias Aund (células tronco “ativa”), enquanto que o BrdU manteve-se constante entre as Aund* (células tronco “reserva” ou “quiescentes”). Dados semelhantes foram encontrados para *Oncorhynchus mykiss*, em que as espermatogônias A indiferenciadas expressam *nanos2* e foram consideradas como células tronco (BELLAICHE *et al.*, 2014). Em tubarões da espécie *Scyliorhinus canícula*, onde as espermatogônias $A_{isoladas}$ são consideradas como sendo células tronco (BOSSEBOUF, *et al.*, 2014). Por outro lado, em roedores e primatas, o mesmo tipo de espermatogônias ($A_{isolada}$) possui subpopulações de células tronco; A_{dark} e A_{pale} (ver revisão OATLEY e BRISNTER, 2012).

A localização das Aund* e Aund que retiveram BrdU permite identificar o local (nicho) onde as células tronco da linhagem germinativa se encontram no compartimento germinativo. Com base nestas observações, foi possível determinar que as espermatogônias Aund* (“reserva”) localizam-se próximas ao compartimento intersticial, enquanto que as Aund encontram-se na região intertubular (região de contato entre dois túbulos, sem compartimento intersticial). Resultados semelhantes foram observados em zebrafish, *Danio rerio* (NÓBREGA *et al.*, 2010) e em mamíferos, como o *Tayassu tajacu* (CAMPOS JUNIOR *et al.*, 2012), onde o nicho espermatogonial foi identificado próximo a região adjacente ao compartimento intersticial. Em nosso estudo evidências sugerem que as células espermatogoniais do tipo Aund (“ativas”) “migram” para a região intertubular para dar continuidade ao processo espermatogênico, enquanto que Aund* (“reserva”) necessitam da influência de fatores encontrados no compartimento intersticial, como por exemplo O_2 dos vasos sanguíneos, hormônios (Fsh, Lh) dentre outros.

Estes dados mostram a importância de se conhecer o nicho, pois elementos do nicho através de seu suporte estrutural e molecular (fatores de crescimento) regulam o destino das espermatogônias tronco (auto-renovação, quiescência e, ou diferenciação) (ver revisão OATLEY e BRISNTER, 2012).

A influência do nicho no destino das células tronco pode ser compreendida no modelo presente nos testículos de *Drosophila melanogaster* (SPRANDLING *et al.*, 2001). Neste modelo é proposto que quanto mais distante do nicho, maior a probabilidade das células tronco se diferenciarem, uma vez que as mesmas estão mais afastadas das condições moleculares e estruturais que as mantém no seu estado indiferenciado.

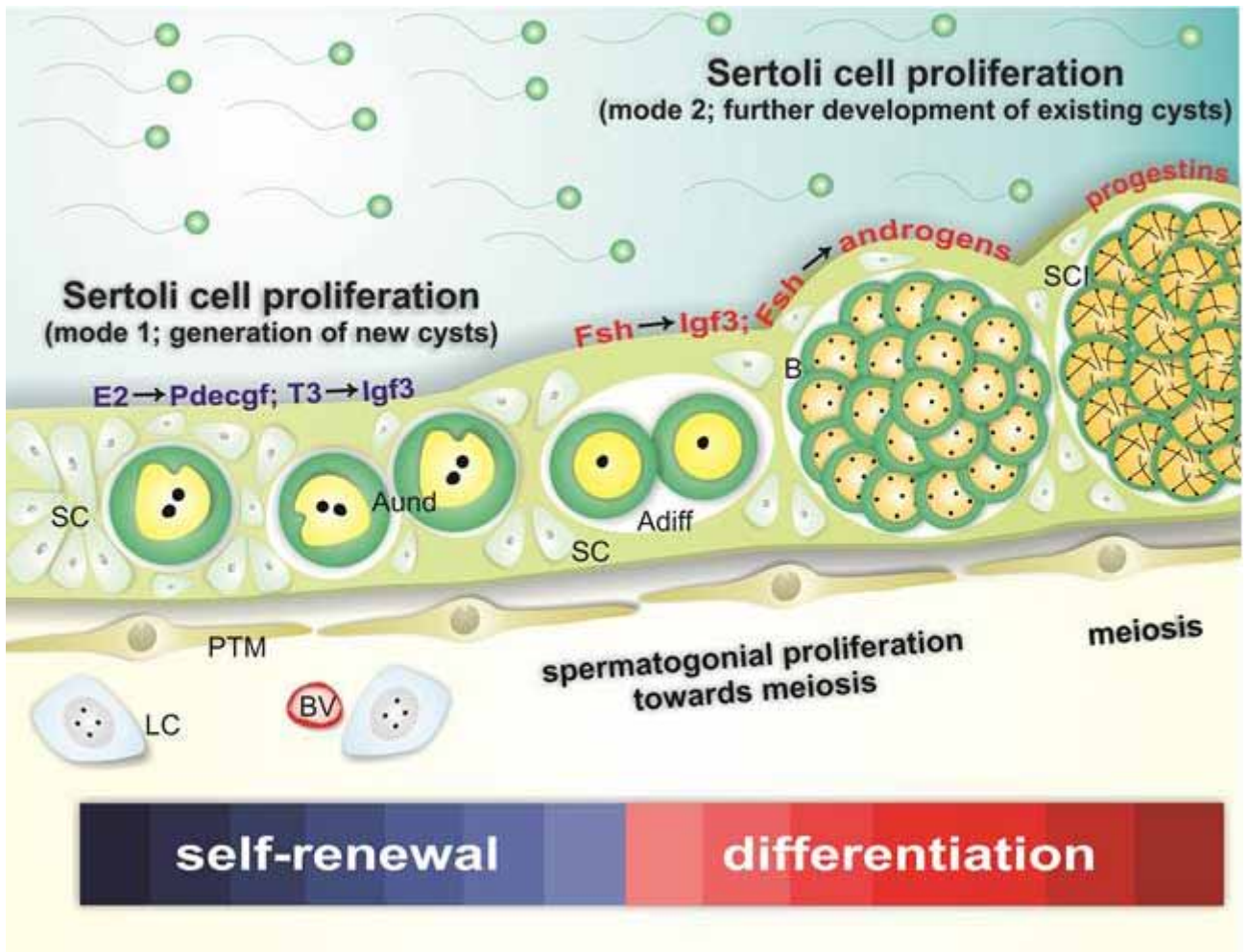
De forma inédita, nosso trabalho também mostra que as células somáticas do testículo também foram capazes de reter BrdU após longo período pós-pulso. Com 3 semanas, células de Sertoli e células de Leydig foram encontradas marcadas com BrdU, sugerindo a existência de elementos tronco para estes tipos celulares. Estudos em outras espécies de peixes, como *Clarias gariepinus*, *Oreochromis niloticus* (SCHULZ *et al.*, 2005) e zebrafish *Danio rerio* (LEAL *et al.*, 2009), mostram a proliferação das células de Sertoli e Leydig após 6 horas e 2 horas de exposição ao BrdU e timidina (timidina – [metil-³H]), respectivamente. Na carpa, número de células de Sertoli que retiveram BrdU (~20 %) foi constante até a segunda semana, quando então, ocorreu uma ligeira queda de seu número (~10 %) na terceira semana. Por meio desta capacidade de retenção do BrdU por longo período de tempo podemos sugerir a existência de células progenitoras de células de Sertoli, ou seja, células de Sertoli tronco. Esta evidência deve-se ao fato de que populações de células tronco são quiescentes e possuem um longo ciclo celular (Li e Clevers, 2010).

As células de Sertoli que retiveram BrdU foram encontradas sozinhas (“free” ou “alone”) (~30 %) no epitélio germinativo, ou estavam associadas com células germinativas (~70 %). A maior parte das células de Sertoli BrdU-positivas estavam associadas à espermatogônias do tipo A indiferenciado (Aund) (~90 %). Isto sugere que a existência de células de Sertoli progenitoras (células tronco) associadas à espermatogônias Aund (também tronco) tem importante papel na criação de novos cistos espermatogênicos, assim como também de fornecer novos elementos somáticos para criar novos “nichos” espermatogoniais. Desta forma, as células de Sertoli mantêm o nicho espermatogonial das células tronco e garantem o sucesso do processo espermatogênico (O’SHAUGHNESSY, 2014), sendo que sua proliferação é importante para garantir a sobrevivência, o desenvolvimento e manutenção das células germinativas (ALVES *et al.*, 2013). Em testículos de animais adultos de *Oreochromis niloticus* e *Clarias gariepinus*, a

proliferação das células de Sertoli foi documentada em associação com cistos de células germinativas, como também em células de Sertoli sozinhas (“free”) no epitélio germinativo (SCHULZ *et al.*, 2005). Em torno de 59% das células de Sertoli marcadas com timidina estavam associadas com espermatogônias Aund, 21% com espermatogônias do tipo B, 9% espermatócitos e 11% com espermátides em *Oreochromis niloticus*. Somente 10% estavam livres (“free”). Em *Clarias gariepinus*, 63% estavam associadas com Aund, 33% com espermatogônias do tipo B e apenas 4% com espermatócitos após 6 horas de exposição ao BrdU (SCHULZ *et al.*, 2005). Esses resultados mostram que a maioria das células de Sertoli em proliferação estavam associadas com espermatogônias Aund. Ainda em *Clarias gariepinus*, estudos mostram que em testículos de animais submetidos à gonadectomia unilateral, foi possível identificar células de Sertoli BrdU-positivas associadas com espermatogônias Aund, após 6 horas de exposição ao BrdU (SCHULZ *et al.*, 2012). Estes autores mostram que células de Sertoli BrdU-positivas foram observadas em associação com espermatogônias BrdU-negativas (SCHULZ *et al.*, 2012).

Estudos mais recentes também mostram que em zebrafish, *Danio rerio*, hormônios tireoidianos (T_3) estimulam a proliferação das células de Sertoli em associação com células germinativas e também a proliferação das células de Sertoli livres (“free”). A maioria das células de Sertoli BrdU-positivas estavam em associação com espermatogônias Aund e, em menor proporção com espermatogônias do tipo B, espermatócitos e espermátides (MORAIS *et al.*, 2013). Os resultados nas diversas espécies de peixes teleósteos mostram que as células de Sertoli proliferam em animais adultos em associação com espermatogônias iniciais (Aund), espermatogônias diferenciadas (Adif, B) e espermatócitos. Acredita-se que este tipo proliferação estaria associado ao desenvolvimento dos cistos pré-existentes (modo 2 de proliferação, ver abaixo), no sentido de aumentar o número de células de Sertoli para suportar o desenvolvimento das células germinativas durante a espermatogênese. Desta forma, assim como todo tipo de célula somática, a células de Sertoli deve possuir uma subpopulação de células de Sertoli tronco que são responsáveis por atender à elevada demanda por novas células de Sertoli que estarão comprometidas com a formação e desenvolvimento de novos cistos espermatogênicos (modo 1 de proliferação). Neste trabalho, de forma inédita, sugerimos a existência das células

de Sertoli tronco (“free” ou associadas às Aund) que seriam responsáveis por formar e manter a fonte de células de Sertoli comprometidas com o desenvolvimento dos cistos. A figura abaixo ilustra de forma didática esta hipótese, com os dois modos de proliferação:



A proliferação modo 1 responsável por gerar novas células de Sertoli e consequentemente novos cistos; é nela que estariam as células de Sertoli tronco como “fonte” destas novas células. E a proliferação modo 2 responsável pelo desenvolvimento dos cistos já existentes.

Duração da espermatogênese

A partir de resultados da avaliação das células BrdU-positivas mais avançadas durante os diferentes intervalos de tempo, foi possível determinar que a duração da espermatogênese a partir da fase meiótica até a formação de espermatozoides na carpa comum, foi de aproximadamente 1 semana. Com 1 semana após o último pulso de BrdU, espermátides em diferentes fases da espermiogênese e espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos foram encontrados marcados pelo BrdU. Em espécies como a *Gambusia affinis* mantidos em temperatura de 25°C, a duração da espermatogênese foi de 10 dias (KOYA e IWASE, 2004), em *Oreochromis niloticus*, a duração da espermatogênese foi dependente da temperatura na qual os animais foram submetidos. Em temperaturas de 25°C teve duração de aproximadamente 11 dias, já quando em temperaturas mais altas (30°C) o ciclo durou 6 dias (VILELA *et al.*, 2003). Estes dados demonstram que o processo espermatogênico em peixes é altamente dependente de fatores ambientais (mudanças de temperaturas), os quais afetam diretamente o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (TARANGER *et al.*, 2010; MIRANDA *et al.*, 2013).

Em *Danio rerio*, a duração da espermatogênese é de aproximadamente 6 dias (LEAL *et al.*, 2009). Diferentemente de anfíbios que a duração da espermatogênese é de aproximadamente 40 dias (SEGATELLI *et al.*, 2009) e répteis, com 54 dias (SOUSA *et al.*, 2014).

Clonagem e caracterização do gene *amh* em carpa comum

Uma sequência de cDNA de 1704 pares de bases, que codifica uma proteína de 567 aminoácidos foi encontrada para carpa comum. Nossos dados corroboram com os obtidos em *Oryzias latipes*, onde a sequência genômica do cDNA corresponde a 1419 pares de bases, que codifica uma proteína de 496 aminoácidos (KLÜVER *et al.*, 2007). Bem como também em *Oreochromis niloticus*, onde foram isolados cDNA com 1545 pares de bases que codificam uma proteína de 514 aminoácidos (POONLAPHDECHA *et al.*, 2011) e em *Lateolabrax japonicus*, onde foram encontrados uma sequência de cDNA de 2219 pares de bases com 70 pares de bases na região 5'-UTR, uma ORF de 1602 pares de

bases com 547 pares de bases na região 3'-UTR, que codifica uma proteína de 534 aminoácidos (CHI *et al.*, 2014).

Tanto em carpa comum quanto nessas outras espécies, foram encontrados um domínio TGF- β na extremidade C-terminal e um domínio Amh na extremidade N-terminal, ambos característicos da família de proteínas Amh, indicando que o *amh* clonado é homólogo dentro do grupo dos peixes teleósteos e que estão evolutivamente distantes dos mamíferos (KLÜVER *et al.*, 2007; PALA *et al.*; 2008; POONLAPHDECHA *et al.*, 2011; CHI *et al.*, 2014).

Comparação de domínios proteicos e análise evolutiva do Amh

Em carpa comum encontramos que os sítios mais conservados são encontrados no domínio TGF- β , o que corrobora com o encontrado por outros autores em diferentes espécies de teleósteos (HOFSTEN *et al.*, 2005, RODRÍGUES-MARÍ *et al.*, 2005, HALM *et al.*, 2007, KLÜVER *et al.*, 2007, PALA *et al.*, 2008, POONLAPHDECHA *et al.*, 2011), pois este domínio na proteína é que vai desempenhar a função de ativação da mesma (BEVILLE *et al.*, 2004).

Evolutivamente, nossos resultados demonstram que o gene *amh* é conservado entre *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus* e *Danio rerio*, os quais pertencem ao grupo dos Cypriniformes (Figura 11), como já indicado nos trabalhos de Pala e colaboradores (2008) e Poonlaphdecha e colaboradores (2011). A ordem Cypriniformes se relaciona com Anguiliformes, e estes com Salmoniformes, e por fim os Salmoniformes como restante dos peixes, como observado por outros autores (RODRÍGUES-MARÍ *et al.*, 2005, HALM *et al.*, 2007, KLÜVER *et al.*, 2007, PALA *et al.*, 2008, POONLAPHDECHA *et al.*, 2011).

Tanto em carpa comum quanto em *Oryzias latipes* (KLÜVER *et al.*, 2007), *Squalius alburnoides* (PALA *et al.*, 2008), *Oreochromis niloticus* (POONLAPHDECHA *et al.*, 2011) e *Lateolabrax japonicas* (CHI *et al.*, 2014), foram encontradas características da família de proteínas Amh (domínio TGF- β na extremidade C-terminal e um domínio Amh na região N-terminal) indicando que o gene *amh* clonado é homólogo dentro do grupo dos peixes teleósteos.

Expressão do *amh* em diferentes tecidos de carpas adultas

Em carpa comum adulta sexualmente madura, o *amh* é expresso tanto em testículos quanto em ovários, porém com maior expressão nos testículos do que em ovários. Níveis menores de *amh* também foram detectados em encéfalos de fêmeas e músculos de machos. A expressão extra-gonadal do *amh* também foi notada em *Oreochromis niloticus* (POONLAPHDECHA *et al.*, 2011), *Lateolabrax japonicus* (CHI *et al.*, 2014), e *Carassius auratus* (LI *et al.*, 2013). Ainda é desconhecido o papel do Amh extra-gonadal nestas espécies de peixes. Trabalhos recentes mostram que a expressão do *amh* no encefálico aumenta durante a diferenciação testicular em *Oreochromis niloticus* (POONLAPHDECHA *et al.*, 2011), sugerindo papel do Amh na diferenciação sexual hipotalâmica/encefálica.

Hibridização *in situ*: localização dos sítios de expressão do *amh* nos testículos de carpas adultas

Nos testículos de carpas sexualmente maduras, os sítios de expressão do *amh* localizam-se em células de Sertoli que envolvem espermatogônias indiferenciadas. A expressão do *amh* em células somáticas (células de Sertoli) também foi observada em outras espécies de peixes, como *Acanthopagrus schlegeli* (WU *et al.*, 2010), *Dicentrarchus labrax* (HALM *et al.*, 2007), *Danio rerio*, (SKAAR e NÓBREGA *et al.*, 2011), *Squalius alburnoides* e *Squalius pyrenaicus* (PALA *et al.*, 2008), *Takifugu rubripes* (KAMIYA *et al.*, 2012), bem como em larvas de *Odontesthes hatcheri* (HATORI *et al.*, 2012), com 21 dias pós fertilização. Em *Gadus morhua*, hibridizações *in situ* mostraram que o *amh* tem seu sítio de expressão na cabeça e no tronco em larvas com 35 dias pós-fertilização (JOHNSEN *et al.*, 2013).

Em ovários, a expressão do *amh* ocorre nas células da granulosa (HALM *et al.*, 2007; PALA *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2010; KAMIYA *et al.*, 2012) em diversas espécies de peixes teleósteos.

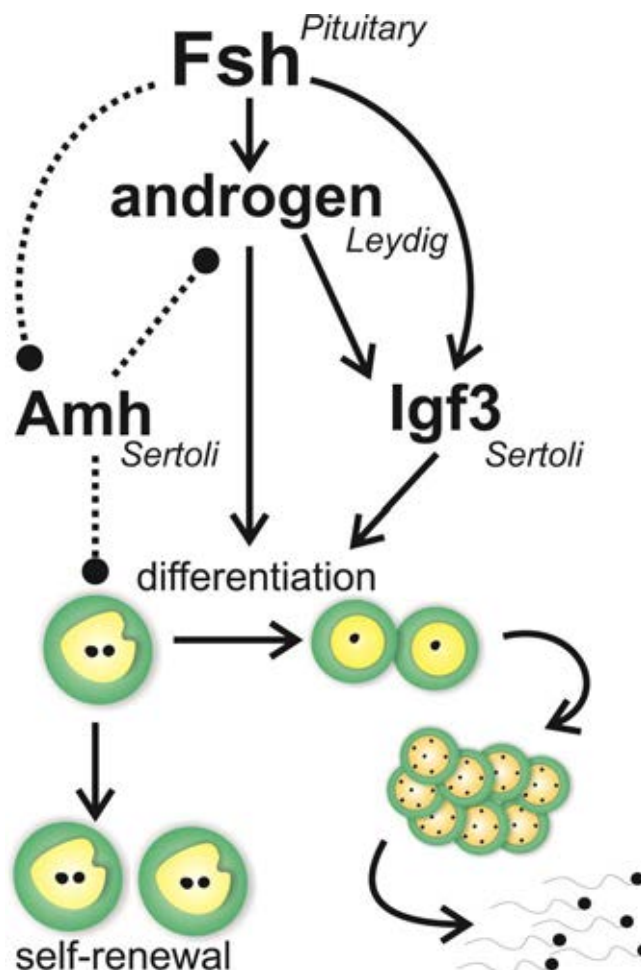
Desta forma, os resultados obtidos para carpa comum e as evidências na literatura sugerem que o Amh deve desempenhar papel parácrino/autócrino no nicho espermatogonial, uma vez que o Amh é produzido pelas células de Sertoli envolvendo espermatogônias indiferenciadas (Aund).

Controle endócrino

A expressão do *amh* foi avaliada em explantes testiculares de carpa (no mesmo estágio reprodutivo) na presença ou ausência do hormônio folículo estimulante de zebrafish (rzf Fsh) e de estrógenos. Apenas as doses de 50 e 100 ng/ml de rzf Fsh e 10 nM de estrógeno foram capazes de diminuir significativamente a expressão do *amh* em relação ao controle após 7 dias de cultivo. Com 18h de cultivo a expressão do *amh* não se altera em nenhum dos tratamentos hormonais. Em testículos de zebrafish, *Danio rerio* (SKAAR e NÓBREGA *et al.*, 2011) os níveis de RNAm de *amh* diminuíram significativamente com altas concentrações de Fsh (500ng/ml) após 18h de cultivo. Resultados semelhantes foram obtidos em explantes testiculares de *Oncorhynchus mykiss in vitro*, onde o Fsh sozinho ou na presença de trilostano (inibidor da 3β HSD, e consequentemente de andrógenos) foram capazes de inibir a expressão do *amh* após 96 horas de cultivo (SAMBRONI *et al.*, 2013a,b). Desta forma, sugere-se que o Fsh necessite de maior tempo para diminuir os níveis de RNAm do *amh*.

Estudos recentes sugerem que o Fsh desempenha importante papel na regulação e atividade espermatogonial em várias espécies de peixes. Por exemplo, níveis elevados de Fsh coincidem com o período de maior atividade espermatogonial em *Oncorhynchus tshawytscha* (CAMPBELL *et al.*, 2003). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que o Fsh estimula a proliferação e diferenciação espermatogonial em testículos juvenis da enguia japonesa *Anguilla japonica* via produção de andrógenos pelas células de Leydig (OHTA *et al.*, 2007; HAIA *et al.*, 2014). Assim, é bem provável que o Fsh regule a diferenciação e proliferação espermatogonial através de fatores de crescimento produzidos pelas células de Sertoli, assim como também através da liberação de andrógenos pelas células de Leydig. O balanço dos fatores de crescimento (estimulatórios e inibitórios) têm uma ação parácrina nas espermatogônias tronco, e determinam, por exemplo sua quiescência, proliferação ou diferenciação (SCHLATT *et al.*, 2014). Sabendo que o Amh bloqueia a proliferação e diferenciação espermatogonial em zebrafish (SKAAR e NÓBREGA *et al.*, 2011), acredita-se que ao diminuir a expressão do *amh*, o Fsh cria uma condição permissiva para as

espermatogônias se proliferarem. Isto também é observado em juvenis de *Dicentrarchus labrax*, onde o Fsh diminui a expressão de *amh* e estimula a proliferação espermatogonial (MAZÓN *et al.*, 2014). Em carpa comum, sugere que o Fsh desempenhe mesmo papel. Além disso, é provável que o Fsh estimule a produção de fatores de crescimento estimulatórios. Dentre estes fatores de crescimento, existe um forte candidato, recentemente estudado em zebrafish, o Igf3 (insulin-like growth factor) (NÓBREGA *et al.*, em preparação). O Igf3 é um novo membro da família dos Igfs, recentemente descoberto que tem expressão localizada apenas nas gônadas de peixes e alguns anfíbios. Estudos recentes mostram que o Igf3 tem seus níveis proteicos e gênicos aumentados na presença do Fsh, além de que o recombinante do Igf3 estimula a proliferação espermatogonial em zebrafish (NÓBREGA *et al.*, em preparação). Desta forma, apresenta-se o seguinte modelo de regulação, que também pode ser aplicado à carpa comum:



Além do Fsh, o estrógeno também apresenta efeito supressivo na expressão do *amh* como também observado em outros peixes (FILBY *et al.*, 2006) como em *Oncorhynchus mykiss* (MARCHAND *et al.*, 2000) e também em *Danio rerio* (SCHULZ *et al.*, 2007) em que relevantes concentrações de estrógeno inibem a expressão do *amh*. Este aumento na concentração de estrógenos é responsável por reduzir a espermatogênese e também diminuir as características sexuais masculinas (FILBY *et al.*, 2007) por inibir o eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Em carpa comum a menor dose de estrógeno (10nM) diminui significativamente a expressão do *amh*. Porém, doses maiores não apresentaram efeito supressivo. Isto pode ser explicado devido ao fato de que o estrógeno, quando em baixas doses, está envolvido na ativação da proliferação espermatogonial, enquanto que em doses maiores, apresenta um efeito inibidor sobre o testículo devido ao bloqueio do eixo-hipotálamo-hipófise-gônada (KOBAYASHI *et al.*, 2011). Concentrações de 100 pg/ml de estrógeno estimulam proliferação espermatogonial em enguia japonesa *Anguilla japonica* (MIURA *et al.*, 2003). Desta forma, para que a proliferação espermatogonial mediada por estrógenos ocorra, os níveis de *amh* devem diminuir para “liberar” as espermatogônias do efeito inibitório do Amh.

Expressão do gene *amh* versus proliferação celular (PCNA)

A expressão do *amh* foi avaliada em dois momentos do ciclo reprodutivo: em testículos regredidos, caracterizados por serem formados principalmente por espermatogônias indiferenciadas (Aund); e em testículos no início da maturação, em que cistos de espermatogônias do tipo B e espermatócitos são encontrados. Também foi comparado os níveis relativos de RNAm de *amh* com a atividade proliferativa das células germinativas e somáticas (células de Sertoli e células de Leydig). Assim, níveis elevados de *amh* foram encontrados em testículos com baixa proliferação espermatogonial e baixa proliferação de células de Sertoli (testículos regredidos). Quando os testículos entram em maturação, marcado por elevada proliferação das espermatogônias indiferenciadas e células de Sertoli, a expressão do *amh* encontra-se reduzida. Desta forma, sugere-se que elevados

níveis de Amh bloqueiam a proliferação tanto das células germinativas como das células de Sertoli.

Porém, quando a expressão do *amh* é suprimida, o nicho fica permissivo a proliferação e diferenciação celular. Dados semelhantes foram observados por Skaar e Nóbrega e seus colaboradores (2011) em testículos de *Danio rerio*. Os autores mostram que o Amh bloqueia a proliferação e diferenciação espermatogonial em zebrafish.

Em *Salmo salar*, os níveis de expressão do *amh* são dependentes do estágio reprodutivo em que se encontra o testículo. Quando os testículos estão em estágio imaturo (maior parte das células germinativas são as espermatogônias indiferenciadas do tipo A), os níveis de expressão são altos, no entanto quando os testículos entram em maturação (espermatogônias começam a se proliferar intensamente), a expressão do *amh* diminui, chegando a níveis basais durante a espermição (MAUGAR e SCHMITZ, 2008), bem como observados em carpa comum. Estes dados sugerem que a supressão do *amh* desempenha um papel crucial no processo de espermatogênese (SKAAR e NÓBREGA *et al.*, 2011). Além disso, é possível que o Amh também tenha um efeito na proliferação das células de Sertoli. Neste sentido, estudos em andamento em nosso laboratório estão sendo realizados para avaliar o efeito do Amh na proliferação das células de Sertoli (“free” ou associadas) em zebrafish. A regulação da proliferação das células de Sertoli em peixes adultos é algo pouco estudado. Apenas um trabalho na literatura mostra que hormônios tireoidianos (T3) estimulam a proliferação das células de Sertoli em zebrafish (MORAIS, *et al.*, 2013). Quanto às células de Leydig, nenhuma alteração em sua atividade proliferativa foi observada em testículos com alta ou baixa expressão de *amh*, sugerindo que outros hormônios/fatores devem interferir na proliferação deste tipo celular.

Conclusão Geral

Neste trabalho, através de “pulse-chase” de BrdU, foram identificados dois candidatos à espermatogônias tronco, uma “reserva” (Aund*) e uma “ativa” (Aund). As espermatogônias “reserva” localizam-se próximas do interstício, de onde dependem de fatores como oxigênio, hormônios, fatores de crescimento

para sua sobrevivência. As espermatogônias “ativa” localizam-se por sua vez na região intertubular. Além dos elementos tronco da linhagem germinativa, foi demonstrado de forma inédita, que células de Sertoli e células de Leydig também devem possuir elementos precursores (tronco) entre sua população de células. Dentre as células de Sertoli precursoras, a maior parte delas encontra-se associada com espermatogônias indiferenciadas, e o restante encontra-se livre (“free”) no epitélio germinativo. As células de Sertoli tronco seriam uma “fonte” inesgotável de novas células de Sertoli, as quais estariam comprometidas com a formação de novos cistos, como também com o desenvolvimento de cistos pré-existentes. Por fim, o gene do hormônio anti-Mülleriano (Amh) foi clonado para carpa comum, caracterizado e seus sítios de expressão determinados. O *amh* é expresso em células de Sertoli que envolvem espermatogônias indiferenciadas (Aund* e Aund) e sua expressão diminui na presença de Fsh e estrógenos. Por fim, foi mostrado que testículos de carpa com maior proliferação das células germinativas e das células de Sertoli possuem baixos níveis de *amh*. Este dado sugere que o Amh bloqueia a proliferação destas células, e portanto deve ser inibido para criar uma condição permissiva para a proliferação das mesmas. Este conhecimento poderá agora ser aplicado no sentido de utilizar o Amh (através de vacinas gênicas, por exemplo) para atrasar a puberdade precoce em espécies nativas/exóticas de interesse econômico. Uma vez que a puberdade for atrasada, os animais poderão utilizar a energia para o crescimento, o que é de grande interesse para produção na aquicultura.

Referências

- ALMENDRAL, J.; HUEBSCH, M.; BLUNDELL, P. A.; MACDONALD-BRAVO, H.; BRAVO, R. Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, vol.84, p.1575–1579, 1987.
- ALVES, M. G.; RATO, L.; CARVALHO, R. A.; MOREIRA, P. I.; SOCORRO, S.; OLIVEIRA, P. F. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.70, p.777–793, 2013.
- BELLAICHE, J.; LAREYRE, J.-J.; CAUTY, C.; YANO, A.; ALLEMAND, I.; LE GAC, F. Spermatogonial Stem Cell Quest: *nanos2*, Marker of a Subpopulation of Undifferentiated A Spermatogonia in Trout Testis. **Biology of Reproduction**, v.90, n.4 **79**, p.1-14, 2014.
- BELVILLE, C.; VLIJMEN, H. V.; EHRENFELS, C.; PEPINSKY, B.; REZAIE, A. R.; PICARD, J.-Y.; JOSSO, N.; CLEMENTE, N. D.; CATE, R. L.. Mutations of the Anti-Müllerian hormone gene in patients with persistent Müllerian duct syndrome: Biosynthesis, secretion, and processing of the abnormal proteins and analysis using a three-dimensional model. **Molecular Endocrinology**, v.18, n.3, p.708–721, 2004.
- BOSSEBOEUF, A.; GAUTIER, A.; AUVRAY, P.; MAZAN, Y.; SOURDAINE, P. Characterization of spermatogonial markers in the mature testis of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.). **Reproduction**, v.147, p.125–139, 2014.
- CAMPOS-JUNIOR, P. H.; COSTA, G. M.; LACERDA, S. M.; REZENDE-NETO, J. V.; PAULA, A. M.; HOFMANN, M. C.; FRANÇA, L. R. The spermatogonial stem cell niche in the Collared Peccary (*Tayassu tajacu*). **Biology of Reproduction**, v.86, n.155, p.1-10, 2012.

- CHI, M. L.; WEN, H. S.; NI, M.; HE, F.; LI, J. F. ; QIAN, K.; ZHANG, P.; CHAI, S. H.; DING, Y. X.; YIN, X. H. Molecular identification of genes involved in testicular steroid synthesis and characterization of the responses to hormones stimulation in testis of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*). **Steroids**, v. 84, p.92–102, 2014.
- FILBY, A. L.; THORPE, K. L.; MAACK, G.; TYLER, C. R. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish. **Aquatic Toxicology**, v.81, n.2, p.219–231, 2007.
- FILBY, A. L.; THORPE, K. L.; TYLER, C. R. Multiple molecular effect pathways of an environmental oestrogen in fish. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.37,p.121–134, 2006.
- HAIA, Y.; HOUA, J.; LIU, Y.; LIU, Y.; YANG, H.; LI, Z.; HE, Z. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.29, p.66–75, 2014.
- HALM, S.; ROCHA, A.; MIURA, T.; PRAT, F.; ZANUY, S. Anti-Müllerian hormone (Amh/Amh) in the European sea bass: Its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms. **Gene**, v.388, p.148–158, 2007.
- HATTORI, R. S.; MURAI, Y.; OURA, M.; MASUDA, S.; MAJHI, S.; SAKAMOTO, T.; FERNANDINO, J.; SOMOZA, G. M.; YOKOTA, M.; STRÜSSMANN, C. A. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. **PNAS**, v.109, n.8, p.2955–2959, 2012.
- HOFSTEN, J. V.; LARSSON, A.; OLSSON, P. E. Novel steroidogenic factor-1 homolog (*ff1d*) is coexpressed with Anti-Mullerian hormone (Amh) in zebrafish. **Developmental Dynamics**, v.233, p.595-604, 2005.

- JOHNSEN, H.; TVEITEN, H.; TORGERSEN, J. S.; ANDERSEN, Ø. Divergent and Sex-Dimorphic Expression of the Paralogs of the Sox9-Amh-Cyp19a1 Regulatory Cascade in Developing and Adult Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.). **Molecular Reproduction & Development**, v.80, p.358–370, 2013.
- KAMIYA, T.; KAI, W.; TASUMI, S.; OKA, A.; MATSUNAGA, T.; MIZUNO, N.; FUJITA, M.; SUETAKE, H.; SUZUKI, S.; HOSOYA, S.; TOHARI, S.; BRENNER, S.; MIYADA, T.; VENKATESH, B.; SUZUKI, Y.; KIKUCHI, K. A Trans-Species Missense SNP in Amhr2 Is Associated with Sex Determination in the Tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). **PLoS Genetics**, v.8, n.7, e1002798, 2012.
- KAUR, G.; THOMPSON, L. A.; DUFOUR, J. M. Sertoli cells – Immunological sentinels of spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.30, p.36–44, 2014.
- KINNBERG, K.; TOFT, G. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.54, p.16–24, 2003.
- KLÜVER, N.; PFENNIG, F.; PALA, I.; STORCH, K.; SCHLIEDER, M.; FROSCHAUER, A.; GUTZEIT, H. O.; SCHARTLL, M. Differential expression of Anti-Müllerian hormone (*amh*) and Anti-Müllerian hormone receptor type II (*amhrII*) in the Teleost Medaka. **Developmental Dynamics**, v.236, p.271-281, 2007.
- KOBAYASHI, Y.; NOZU, R.; NAKAMURA, M. Role of Estrogen in Spermatogenesis in Initial Phase Males of the Three-Spot Wrasse (*Halichoeres trimaculatus*): Effect of Aromatase Inhibitor on the Testis. **Developmental Dynamics**, v.240, p.116–121, 2011.
- KOYA, Y.; IWASE, A. Annual reproductive cycle and rate of the spermatogenic process in male mosquito-fish *Gambusia affinis*. **Ichthyological Research**, v.51, p.131–136, 2004.

- LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; W. SCHULZ, R. W. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. **Biology of Reproduction**, v.81, p.177–187, 2009.
- LI, L.; CLEVERS, H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. **Science**, v.327, p.542, 2010.
- LI, M.; WANG, L.; WANG, H.; LIANG, H.; ZHENG, Y.; QIN, F.; LIU, S.; ZHANG, Y.; WANG, Z. Molecular cloning and characterization of *amh*, *dax1* and *cyp19a1a* genes and their response to 17 α -methyltestosterone in Pengze crucian carp. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.157, p.372–381, 2013.
- MARCHAND, O.; GOVOROUN, M.; D’COTTA, H.; MCMEEL, O.; LAREYRE, J.; BERNOT, A.; LAUDET, V.; GUIGUEN, Y. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1493, p.180–187, 2000.
- MARÍN-JUEZ, R.; VIÑAS, J.; MECHALY, A.; PLANAS, J.; PIFERRER, F. Stage-specific gene expression during spermatogenesis in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*), a fish with semi-cystic type of spermatogenesis, as assessed by laser capture microdissection and absolute quantitative PCR. **General and Comparative Endocrinology**, v.188, p.242–250, 2013.
- MAUGARS, G.; SCHMITZ, M. Changes in expression profiles of genes related to sexual maturation during spermatogenesis in testes of early-maturing male Atlantic salmon parr, *Salmo salar*. **Cybium**, v.32, n.2, p.167-168, 2008.

- MAZÓN, M, J.; GÓMEZ, A.; YILMAZ, O.; CARRILLO, M.; ZANUY, S. Administration of follicle-stimulating hormone in vivo triggers testicular recrudescence of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Biology of Reproduction**, vol.90, n.1, 6, 1-10, 2014.
- MIRANDA, L. A.; CHALDE, T.; ELISIO, M.; STRÜSSMANN, C. A. Effects of global warming on fish reproductive endocrine axis, with special emphasis in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **General and Comparative Endocrinology**, v.192, p.45–54, 2013.
- MIURA, T.; MIURA, C. I. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. **Fish Physiology and Biochemistry**, vol.28, p.181-186, 2003.
- MORAIS, R. D. V. S.; NÓBREGA, R. H.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, N. E.; SCHMIDT, R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; SCHULZ R. W. Thyroid hormone stimulates the proliferation of Sertoli cells and single type A spermatogonia in adult zebrafish (*Danio rerio*) testis. **Endocrinology**, v.154, n.11, 4365-76, 2013.
- O'SHAUGHNESSY, P. J. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.29, p.55–65, 2014.
- OATLEY, J. M.; BRINSTER, R. L. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. **Physiological reviews**, v.92, n.2, 577-95, 2012.
- OHTA, T.; MIYAKE, H.; MIURA, C.; KAMEI, H.; AIDA, K.; MIURA, T. Follicle-Stimulating Hormone Induces Spermatogenesis Mediated by Androgen Production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. **Biology of Reproduction**, v.77, p.970–977, 2007.
- PALA, I.; KLÜVE, N.; THORSTEINSDÓTTIR, S.; SCHARTL, M.; COELHO, M. M. Expression pattern of anti-Müllerian hormone (*amh*) in the hybrid fish complex of *Squalius alburnoides*. **Gene**, v.410, p.249–258, 2008.

- PAPAH; M.B.; KISIAA, S.M.; OJOOA, R.O.; MAKANYAA, A.N.; WOODB, C.M.; KAVEMBED, G.D.; MAINAE, J.N.; JOHANNSSONF, O.E.; BERGMANG, H.L.; LAURENTB, P.; CHEVALIERB, C.; BIANCHINIH, A.; BIANCHINIH, L.F.; ONYANGO, D.W. Morphological evaluation of spermatogenesis in Lake Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*): a fish living on the edge. **Tissue & Cell**, vol.45, n.6, 371-82, 2013.
- POONLAPHDECHA, S.; PEPEY, E.; HUANG, S.-H.; CANONNE, M.; SOLER, L.; MORTAJI, S.; MORAND, S.; PFENNIG, F.; MÉLARD, C.; BAROILLER, J. F.; D'COTTA, H. Elevated *amh* gene expression in the brain of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) during testis differentiation. **Sexual Development**, v.5, p.33–47, 2011.
- RODRÍGUEZ-MARÍ, A.; YAN, Y.-L.; BREMILLER, R. A.; WILSON, C.; CAÑESTRO, C.; POSTLETHWAIT, J. H. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (*amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. **Gene Expression Patterns**, v.5, p.655–667, 2005.
- SAMBRONI, E.; LAREYRE, J.-J.; LE GAC, F. Fsh Controls Gene Expression in Fish both Independently of and through Steroid Mediation. **PLoS ONE**, v.8, n.10, e76684, 2013a.
- SAMBRONI, E.; ROLLAND, A. D.; LAREYRE, J.-J.; LE GAC, F. Fsh and Lh have common and distinct effects on gene expression in rainbow trout testis. **Journal of Molecular Endocrinology**, vo.50, p.1–18, 2013b.
- SCHLATT, S.; EHMCKE, J. Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.29, p.2–16, 2014.
- SCHULZ, R. W.; BOGERD, J.; MALE, R.; BALL, J.; FENSKE, M.; OLSEN, L. C.; TYLER, C. R. Estrogen-induced alterations in *amh* and *dmrt1* expression

signal for disruption in male sexual development in the zebrafish. **Environmental Science & Technology**, v.41, p.6305–6310, 2007.

SCHULZ, R. W.; DIJK, W. V.; CHAVES-POZO, E.; GARCÍA-LÓPEZ, A.; FRANÇA, L. R.; BOGERD, J. Sertoli cell proliferation in the adult testis is induced by unilateral gonadectomy in African catfish. **General and Comparative Endocrinology**, v.177, p.160–167, 2012.

SCHULZ, R. W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; VILELA, D. R.; GODINHO, H. P. Sertoli Cell Proliferation in the Adult Testis—Evidence from Two Fish Species Belonging to Different Orders. **Biology of Reproduction**, v.73, p.891–898, 2005.

SCHULZ, R. W.; NÓBREGA, R. H. Regulation of Spermatogenesis. **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**, vol.1, p.627-634. 2011.

SEGATELLI, T. M.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Theriogenology**, v.72, p. 894–901, 2009.

SHEN, L. -J.; CAO, L. -F.; CHEN, F. -Y.; ZHANG, Y.; ZHONG, J. -H.; ZHONG, H. Using modified whole-mount *in situ* hybridization to study *mpo* expression in zebrafish. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.5, p.1043-1047, 2013.

SIMON, P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT–PCR data. **Bioinformatics**, v.19, n.11, p.1439–1440, 2003.

SKAAR*, K. S.; NÓBREGA*, R. H.; MAGARAKI, A.; OLSEN, L. C.; SCHULZ, R. W.; MALE, R. Proteolytically Activated, Recombinant AntiMüllerian Hormone Inhibits Androgen Secretion, Proliferation, and Differentiation of Spermatogonia in Adult Zebrafish Testis Organ Cultures. **Endocrinology**, v.152, n.9, p.3527–3540, 2011* Equal contribution.

- SOUSA, A. L.; CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; COSTA, G. M. J.; FRANÇA, L. R. Spermatogenic cycle length and sperm production in the freshwater turtle *Kinosternon scorpioides*. **Biology of Reproduction**, v.90, n.2 **35**, p.1–10, 2014.
- SPRADLING, A.; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KAI, T. Stem cells find their niche. **Nature**, v.414, p.98-104, 2001.
- TAKAHASHI , T.; CAVINESS, V. S. JR. PCNA-binding to DNA at the G1 /S transition in proliferating cells of and a hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat the developing cerebral wall. **Journal of Neurocytology**, vol.22, p.1096–1102, 1993.
- TARANGER, G. L.; CARRILLO, M.; SCHULZ, R. W.; FONTAINE, P.; ZANUY, S.; FELIP, A.; WELTZIEN, F.-A.; DUFOUR, S.; KARLSEN, Ø.; NORBERG, B.; ANDERSSON, E.; HANSEN, T. Control of puberty in farmed fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, p.483–515, 2010.
- TARULLI, G. A.; STANTON, P. G.; LERCHL,A.; MEACHEM, S. L. 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, p.798–806, 2006.
- VAN DE KANT, H. J. G.; DE ROOIJ, D. G. Periodic acid incubation can replace hydrochloric acid hydrolysis and trypsin digestion in immunogold-silver staining of bromodeoxyuridine incorporation in plastic sections and allows the PAS reaction. **Histochemical Journal**, v.24, p.170–175, 1992.
- VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G. B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.28, p.187–190, 2003.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Brasília, Ed CODEVASF, 1989, p.225.

WU, G.-C.; CHIU, P.-C.; LYU, Y.-S.; CHANG, C.-F. The Expression of amh and amhr2ls associated with the development of gonadal tissue and sex change in the Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. **Biology of Reproduction**, v.83, p.43–453, 2010.