BRUNA VISCARDI AZEVEDO

Caracterização da maturação sexual e reposição hormonal em camundongos com hipopituitarismo congênito por mutação no PROP1

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Orientadora: Profa. Dra. Luciani Renata Silveira de Carvalho

São Paulo

2021

BRUNA VISCARDI AZEVEDO

Caracterização da maturação sexual e reposição hormonal em camundongos com hipopituitarismo congênito por mutação no PROP1

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Orientadora: Profa. Dra. Luciani Renata Silveira de Carvalho

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Azevedo, Bruna Viscardi
Caracterização da maturação sexual e reposição hormonal em camundongos com hipopituitarismo congênito por mutação no PROP1 / Bruna Viscardi Azevedo. -- São Paulo, 2021.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.
Orientadora: Luciani Renata Silveira de Carvalho.

Descritores: 1.Hipopituitarismo/congênito 2.PROP1 3.Puberdade 4.Maturação sexual 5.Camundongos ames 6.Hipófise

USP/FM/DBD-211/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Trabalho realizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM42) do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC-FMUSP e no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Á minha orientadora e mãe cientifica Luciani Renata Silveira de Carvalho, um agradecimento especial, por sempre me acolher e ter depositado sua confiança em mim para a realização deste trabalho, você é uma inspiração e um exemplo de pessoa para mim.

Aos colegas do Biotério Central da FMUSP, em especial ao Robson Cruz e a Jacqueline Keilla.

Aos colegas do LIM/05, em especial á Mariana Veras e o Victor Yuji, por toda a ajuda e paciência.

Á minha amiga e colega Juliana Moreira, pela mentoria durante todos esses anos.

Á todos os colegas do LIM/42, pelos momentos agradáveis e troca de experiências.

Ás queridas funcionárias Nilda Oliveira (*in memorian*) e Rosangele Zamboni, pela contribuição constante.

Ao laboratório da Divisão de Urologia da Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina, em especial a Leticia Kaory, por toda a parceria e ajuda durante a pandemia.

Á Profa Berenice Bilharinho de Mendonça, por ser sempre um exemplo e inspiração para todos nós.

Á toda a minha família, pelo incentivo, por acreditarem em mim e pela torcida.

O insucesso é apenas uma oportunidade

para recomeçar com mais inteligência

Henry Ford

Normatização Adotada

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:
Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Documentação; 2011.
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

Sumário

1 Introdução..... 1
1.1 Embriogênese e desenvolvimento da glândula hipofisária..... 2
1.2 Fatores de transcrição e vias de sinalização..... 3
1.3 Histórico dos modelos animais com hipopituitarismo congênito: deficiências hormonais, diagnóstico molecular e caracterização anatômica hipofisária..... 6
1.4 Maturação sexual e desenvolvimento puberal dos camundongos..... 9
1.4.1 Caracterização da puberdade e fertilidade no camundongo macho..... 11
1.5 Impacto da reposição hormonal no crescimento e fertilidade..... 13
2 Justificativa..... 18
3 Objetivos..... 20
3.1 Objetivo primário..... 21
3.2 Objetivos secundários..... 21
4 Material e métodos..... 22
4.1 Aspectos éticos..... 23
4.2 Descrição da Linhagem..... 23
4.3 Avaliação da fertilidade espontânea dos animais mutados..... 24
4.4 Amostras..... 25
4.5 Reposição hormonal..... 25
4.6 Avaliação da maturidade sexual dos camundongos machos..... 26
4.7 Eutanásia..... 26
4.8 Dados antropométricos..... 27
4.9 Avaliação da fertilidade..... 28
4.10 Avaliação histológica dos testículos..... 28
4.11 Espermograma..... 30
4.12 Avaliação Molecular..... 31
4.13 Análise estatística..... 34

5 Resultados..... 35
6 Discussão..... 51
7 Conclusão..... 64
8 Referências Bibliográficas..... 67
9 Anexos..... 78

Lista de Siglas

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AR	Receptor Androgênico
αGSU	Subunidade Alfa Glicoproteica
bGH	GH bovino
cDNA	DNA complementar
Cga	Gene codificador da Unidade Alfa Glicoproteica
DP	Desvio-padrão
dpc	Dias pós-coito
E	Dia embrionário
FSH	Hormônio foliculoestimulante
Fsh	Gene codificador do hormônio foliculoestimulante
GH	Hormônio de crescimento
Gh	Gene codificador do hormônio de crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
Gli2	*GLI Family zinc finger 2*
GATA2	*GATA binding protein 2*
Gapdh	*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
HE	Hematoxilina-Eosina
Hesx1	*Homeobox Gene Expressed in Embrionic Stem Cell 1*
HPG	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
LH	Hormônio Luteinizante
Lh	Gene codificador do hormônio luteinizante
LHX3	*LIM Homeobox 3*
LHX4	*LIM Homeobox 4*
Kis1R	Receptor de Kisspeptina
Kiss1	Kisspeptina
NR5A1	*Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1*
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPiA	*Peptidylprolyl isomerase A*
Pit1	*Pituitary-Specific Transcription Factor 1 (Pou1f1)*
Pou1f1	*POU Class 1 Homeobox 1*
Prop1	*Prophet of Pit1, Paired-Like Homeodomain Transcription Factor*

PRL	**Hormônio Prolactina**
Prl	Gene codificador do Hormônio Prolactina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
Sox2	*SRY-Box Containing Gene 2*
Sox3	*SRY-Box Containing Gene 3*
STAT5	*Signal transducters and activators of transcription 5*
SF-1	*Steroidogenic factor 1*
TSH	Hormônio Tireoestimulante
Tsh	Gene codificador de Hormônio Tireoestimulante

Lista de Tabelas

TABELA 1. Descrição do Escore de Johnsen..... 29

TABELA 2. Descrição dos genes utilizados na análise de expressão..... 33

TABELA 3. Comparação do número de plugs e média de prole entre os casais totalmente heterozigotos e os casais mutantes..... 36

TABELA 4. Comparação do número de prole entre os casais controles e os casais de machos mutantes tratados..... 37

TABELA 5. Comparação dos valores dos escores de Johnsen entre os grupos..... 43

TABELA 6. Dados do espermograma dos grupos analisados..... 48

Lista de Figuras

Figura 1. Fatores de transcrição envolvidos na determinação e diferenciação celular..... 5

Figura 2. Linhagens Snell e Ames. A) Camundongos da linhagem Snell (*Pou1f1*) com 8 semanas de vida. Animais selvagens nas extremidades e mutantes ao centro; B) Camundongos da linhagem Ames (*Prop1*) com 8 semanas de vida. A direita da foto: animal mutante, e a esquerda: animal selvagem..... 7

Figura 3. Modelo de desenvolvimento hipofisário em camundongo normal e com deficiência do fator de transcrição *Prop1* 8

Figura 4. Padrão histológico no macho controle..... 44

Figura 5. Padrão histológico no macho mutante tratado..... 45

Figura 6. Padrão histológico no macho mutante controle..... 46

Figura 7. Padrão histológico no macho mutante controle que apresentou maturação sexual..... 47

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Média de dias para atingir a maturidade sexual entre os grupos analisados 38

Gráfico 2. Média do peso em gramas nos diferentes grupos analisados no momento da maturação sexual..... 39

Gráfico 3. Média do peso corporal em gramas entre os grupos com 30 dias pós-natal..... 40

Gráfico 4. Média do peso corporal em gramas entre os grupos com 90 dias pós-natal..... 41

Gráfico 5. Média do comprimento naso-anal em centímetros entre os grupos com 90 dias pós-natal..... 41

Gráfico 6. Média do peso testicular em gramas entre os grupos com 90 dias pós-natal..... 42

Gráfico 7. Expressão relativa dos genes *Gh* e *Prl* nos diferentes grupos..... 49

Gráfico 8. Expressão relativa dos genes *Lh*, *Fsh*, Tsh e do fator de transcrição *Gata2* nos diferentes grupos..... 50

RESUMO

Azevedo BV. *Caracterização da maturação sexual e reposição hormonal em camundongos com hipopituitarismo congênito por mutação no PROP1* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A linhagem Ames, camundongo mutante espontâneo do gene *Prop1*, cursa com deficiência de GH, TSH, PRL e gonadotrofinas. Nos últimos anos, tem sido foco de estudo em envelhecimento e apresenta crescente interesse de elucidar o papel da reposição hormonal no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG). O presente trabalho prospectivo teve como objetivo caracterizar a maturação sexual e analisar os dados de reprodução da linhagem Ames isogênica com e sem reposição hormonal. Cinco animais homozigotos machos foram tratados via injeções intraperitoneais, a partir de 30 dias pós natal, com levotiroxina 3 vezes por semana e GH recombinante humano 5 vezes por semana por um período de 40 dias, seguido por aplicações de manutenção de ambos os hormônios uma vez na semana até completarem 90 dias pós natal. A maturidade sexual desses animais foi avaliada e comparada com seus irmãos selvagens (n=5) e homozigotos sem tratamento (n=5). As avaliações da fertilidade e dos parâmetros reprodutivos foram feitos entre os grupos utilizando corte histológicos dos testículos (HE), espermograma, peso testicular e analise transcricional (RT-qPCR) de fator de transcrição e hormônios hipofisários. Os animais homozigotos tratados comparados aos animais selvagens apresentaram um atraso de 2 semanas na idade de maturação sexual, mas tiveram sua fertilidade e parâmetros reprodutivos restaurados (aumento de peso testicular, melhora da espermatogênese e dos achados do espermograma e aumento da expressão de LH e FSH). Os animais homozigotos sem tratamento, não apresentaram prole. A maturidade sexual durante o período analisado foi ausente na grande maioria dos animais analisados, exceto em 1. Os parâmetros reprodutivos também se mostraram diminuídos neste grupo. O presente trabalho demonstra que o tratamento com GH e levotiroxina apresenta restauro dos parâmetros reprodutivos pela estimulação hormonal, corroborado pelo aumento significativo ($p \leq 0,048$) nos níveis de expressão de LH dos animais sob

tratamento (1,56 ± 0,68) em relação aos homozigotos sem intervenção hormonal (0,36 ± 0,34). O tratamento com GH e T4 restaura os parâmetros reprodutivos periféricos nos camundongos Ames mutados do sexo masculino.

Descritores: PROP1; Hipopituitarismo congênito; Puberdade; Maturação sexual Camundongos Ames; Hipófise.

ABSTRACT

Azevedo BV. *Characterization of sexual maturation and hormone replacement in mice with congenital hypopituitarism by mutation in* PROP1 [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

The Ames strain, a spontaneous mutant mouse of the *Prop1* gene, is deficient in GH, TSH, PRL and gonadotropins. In recent years, it has been the focus of studies on aging and there is a growing interest in elucidating the role of hormone replacement in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. This prospective study aimed to characterize the sexual maturation and analyze the reproduction data of the isogenic Ames lineage with and without hormone replacement. Five homozygous male animals were treated via intraperitoneal injections, starting 30 days postnatally, with levothyroxine 3 times a week and recombinant human GH 5 times a week for a period of 40 days, followed by maintenance applications of both hormones once a week until they complete 90 days post natal. The sexual maturity of these animals was evaluated and compared with their wild siblings (n=5) and homozygous untreated (n=5). Fertility and reproductive parameters were evaluated between groups using histological sections of the testes (HE), spermogram, testicular weight and transcriptional analysis (RT-qPCR) of transcription factor and pituitary hormones. The homozygous treated animals compared to wild animals showed a delay of 2 weeks in the age of sexual maturation, but had their fertility and reproductive parameters restored (increase in testicular weight, improved spermatogenesis and spermogram findings and increased LH expression and FSH). Untreated homozygous animals had no offspring. Sexual maturity during the analyzed period was absent in most of the animals analyzed, except for 1. The reproductive parameters were also reduced in this group. The present work demonstrates that the treatment with GH and levothyroxine restores the reproductive parameters by hormonal stimulation, corroborated by the significant increase ($p \leq 0.048$) in the LH expression levels of the animals under treatment (1.56 ± 0.68) in relation to homozygotes without hormonal intervention (0.36 ± 0.34). Conclusion: Treatment with GH and T4 restores peripheral reproductive parameters in male Ames mutated mice.

Descriptors: PROP1; Hypopituitarism/congenital; Puberty; Sexual maturation; Ames mice; Pituitary gland.

1. Introdução

1.1 Embriogênese e desenvolvimento da glândula hipofisária.

A hipófise é uma glândula localizada na sela túrsica do osso esfenóide, na base craniana e é responsável por coordenar diversos eventos fisiológicos através da produção e secreção de hormônios que agem diretamente em órgãos periféricos. Essa glândula desempenha um papel vital no crescimento pós-natal, reprodução, metabolismo, lactação, resposta ao estresse e homeostase (Otto et al., 2015).

Sua função está sob controle direto do sistema nervoso central (SNC) por meio de neuropeptídeos hipotalâmicos que irão sinalizar a hipófise para produção e secreção hormonal e pelo mecanismo de retroalimentação negativa exercido pelos hormônios periféricos produzidos em seus órgãos-alvo (Schneider et al., 2007).

Essa glândula é composta por duas estruturas anatômicas distintas: a adenohipófise e a neurohipófise. A adenohipófise é formada pelo lobo anterior, pelo lobo intermediário e pela parte tuberal. O lobo anterior é derivado do ectoderma oral e, quando maduro, contem células que irão se diferenciar em 5 linhagens distintas: o corticotrofo, responsável pela produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); o tireotrofo que produz o hormônio tireotrófico (TSH); o somatotrofo, produtor do hormônio do crescimento (GH); o lactotrofo, produtor de prolactina (PRL), e o gonadotrofo produtor do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo-estimulante (FSH) (HZ and H, 1999;Kronenberg and Williams, 2008;M and MG, 1996). Por sua vez, a neurohipófise é composta pelo lobo posterior que tem sua origem embrionária no neuroectoderma. Esta consiste em uma projeção dos neurônios da eminência média hipotalâmica e é

responsável pelo armazenamento e secreção dos hormônios antidiurético (ADH) e ocitocina (H, 2012;Nunes, 2012).

Os mecanismos envolvidos na formação da hipófise e na diferenciação das linhagens hormonais são altamente conservados entre os mamíferos, tornando os estudos em camundongos modelos adequados para o conhecimento deste complexo sistema (X et al., 2007). Nesses animais o primeiro sinal de desenvolvimento hipofisário ocorre em 7,5 dias pós coito (dpc) com o desenvolvimento da placa hipofisária e, por volta de 9 dpc, ocorre o espessamento do ectoderma oral que sofre uma invaginação e dá origem à uma bolsa de Rathke rudimentar, primórdio dos lobos anterior e intermediário (D et al., 2009). Aos 10,5 dpc uma região restrita do diencéfalo ventral, acima da bolsa de Rathke, dá origem ao infundíbulo, do qual a porção posterior e haste hipofisária irão derivar. É também aos 10,5 dpc que a bolsa de Rathke se desenvolve totalmente e, aos 12,5 dpc, é completamente separada do ectoderma oral subjacente (D et al., 2009;HL et al., 1999) (Figura 1).

1.2 Fatores de transcrição e vias de sinalização

A organogênese hipofisária resulta de uma complexa interação de vias de sinalização que levam a uma expressão coordenada de fatores de transcrição em períodos e regiões específicas. Esses fatores hipofisários são responsáveis pelo controle da transcrição de genes-alvo através da ligação de seus homeodomínios a sítios específicos de DNA na região promotora dos mesmos, promovendo a ativação ou repressão da expressão genica.

Para que a diferenciação das linhagens hormonais hipofisárias aconteça é necessário que células tronco presentes na glândula passem por um processo

de comprometimento e diferenciação tornando-se células progenitoras que, sob a influência de diversos fatores transcricionais, darão origem às linhagens celulares responsáveis pela produção e secreção dos hormônios hipofisários (TSH, PRL, GH, LH/FSH, ACTH) (N et al., 2015).

Um dos fatores de transcrição responsável por essa dinâmica é o *Prop1*, ele é expresso especificamente nas células embrionárias da hipófise, sendo extremamente importante na determinação específica da linhagem gonadotrófica e corticotrófica e na ativação do gene *Pou1f1* (também conhecido como *Pit1*) que resulta na determinação da linhagem *Pit1* dependente, implicada na diferenciação dos tireotrofos, somatotrofos e lactotrofos. (A et al., 2000;DE and SA, 1998;HZ and H, 1999;JS and MG, 2001;M et al., 1998;M and MG, 1996;MG et al., 2000;MW et al., 1996;PE, 2000) (Figura 1).

Além do *Prop1* e do *Pou1f1*, foi demonstrado recentemente que o fator de transcrição *Gata2*, presente numa fase mais precoce do processo de diferenciação celular, tem um impacto importante na diferenciação dos tireotrofos e gonadotrofos, sendo que há um aumento de sua ativação nos estágios celulares mais intermediários dessas linhagens (S et al., 2020) (Figura 1).

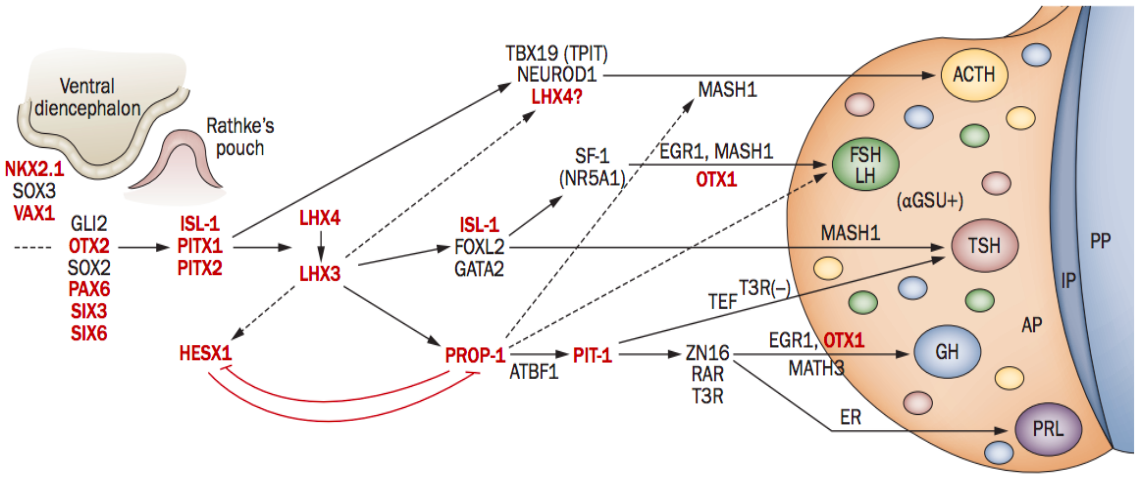

Figura 1: Fatores de transcrição envolvidos na determinação e diferenciação celular (Prince et al., 2011).

Mutações em alguns desses fatores de transcrição pode afetar o desenvolvimento de uma ou de várias linhagens hormonais, causando então um déficit na produção e na secreção dos hormônios hipofisários, caracterizando um quadro conhecido como hipopituitarismo congênito. (CJ et al., 2009;D et al., 2009).

As manifestações clínicas do hipopituitarismo podem ser inespecíficas, porém, entre as deficiências dos hormônios da adeno-hipófise, a deficiência de GH (GHD) é mais comumente diagnosticada e geralmente se manifesta após os dois anos de idade quando a criança apresenta baixa estatura ou velocidade de crescimento diminuída (AL, 2003).

Dentre as causas genéticas de deficiência hormonal hipofisária múltipla em humanos, destaca-se a presença de variantes patogênicas nos genes *PROP1* e *POU1F1* (W et al., 1998) . Sendo que as variantes no *PROP1* vem sendo atribuídas a principal causa de hipopituitarismo congênito em casos familiares e consanguíneos (JL et al., 2017).

Em 1998, Wu e cols. (W et al., 1998) descreveram pacientes portadores de hipopituitarismo em 4 famílias não relacionadas com mutação no gene *PROP1*. As mutações no gene *PROP1* em humanos estão associadas a quadro clínico de deficiência de GH, PRL, TSH e gonadotrofinas. Alguns pacientes podem apresentar na evolução do quadro uma progressão com deficiência de cortisol (Mendonca et al., 1999).

Parte do componente genético envolvido na etiologia molecular da deficiência congênita combinada de hormônios hipofisários em humanos, foram identificados através de animais com comprometimento em genes da cascata embrionária como *Prop1, Pou1f1, Hesx1, Gli2, Sox2, Sox3, Lhx3* e *Lhx4* (Madeira et al., 2017), fazendo destes animais excelentes modelos de estudo.

1.3 **Histórico dos modelos animais com hipopituitarismo congênito: deficiências hormonais, diagnostico molecular e caracterização anatômica hipofisária.**

O primeiro relato de observação de uma prole de camundongos com déficit de crescimento (“dwarf mice”) foi no início do século XX quando Snell observou o crescimento linear inadequado de alguns camundongos de sua colônia. Além da redução de crescimento, os animais apresentavam lentificação motora e infertilidade (tanto machos como fêmeas) (GD, 1929) e cursavam com deficiência de GH, PRL e TSH (Figura 2-A) (SA et al., 1990). Aproximadamente sessenta anos depois, foi demonstrado que esta linhagem de camundongo mutante observada por Snell apresentava mutação no gene *Pou1f1*(*Pit-1*) (SA et al., 1990).

Outro modelo animal de hipopituitarismo congênito é a linhagem Ames (Figura 2-B) descrito em 1961 na cidade de Ames, por Schaible e Gowen. Esse modelo animal é um mutante espontâneo no gene *Prop1,* localizado no cromossomo 11, sendo que sua localização gênica foi descrita somente em 1996 por Sornson e colaboradores (Sornson et al., 1996). Esses animais são fenotipicamente iguais ao nascimento, porém a partir do 14° dia pós natal apresentam um atraso no crescimento e desenvolvimento, sendo que na vida adulta, eles apresentam uma redução de aproximadamente 1/3 do peso corporal em comparação aos seus irmãos selvagem (WT) e heterozigoto (HET) (A, 1965).

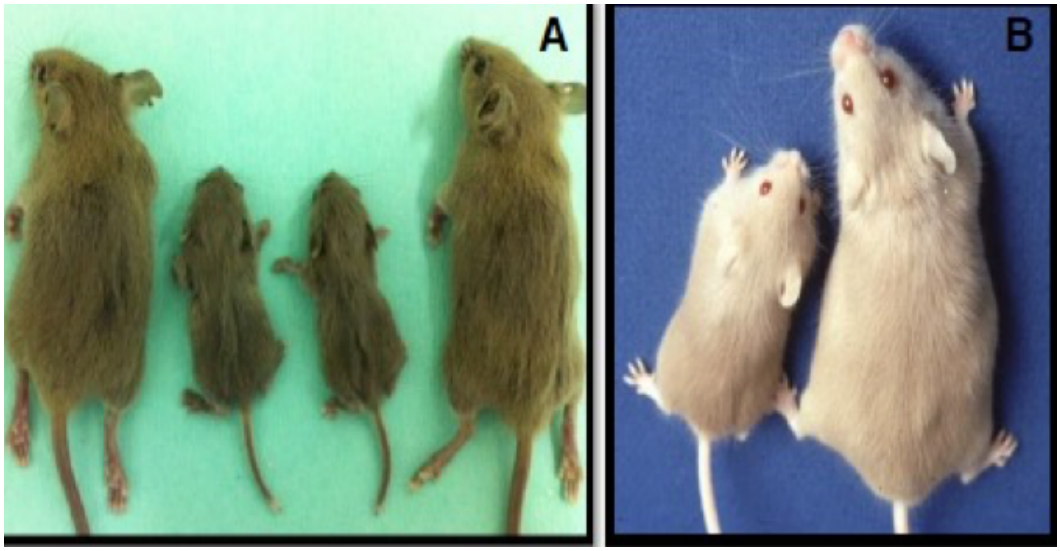

Figura 2: Linhagens Snell e Ames. A) Camundongos da linhagem Snell (*Pou1f1*) com 8 semanas de vida. Animais selvagens nas extremidades e mutantes ao centro; B) Camundongos da linhagem Ames (*Prop1*) com 8 semanas de vida. A direita da foto: animal selvagem, e a esquerda: animal mutante.

No desenvolvimento hipofisário de camundongos normais a expressão do gene *Prop1* é observada na região dorsal da adenohipófise por volta do 10° dia embrionário (E10-E10.5) atingindo seu pico de expressão por volta do 12° dia embrionário (E12.5), onde as células progenitoras migram ventralmente para o lobo anterior em que irão se desenvolver e iniciar o processo de diferenciação

(LT et al., 2002;RD et al., 2005). No dia E14.5, ocorre a ativação do *Pou1f1* (*Pit1*) levando à especificação da linhagem *Pit 1* dependente. A partir deste período começa também o processo de redução da expressão do *Prop1*, com ausência do mesmo na glândula adulta (D et al., 2009;RD et al., 2006).

Depois do nascimento, de P1 (dia 1 pós natal) a P11 (dia 11 pós natal), a linhagem *Pou1f1* (*Pit1*) sofre a proliferação ativa e o lobo anterior expande-se lateralmente (RD et al., 2006). No animal *Prop1*$^{-/-}$ (linhagem Ames), a migração ventral é bloqueada, resultando em dismorfismo da bolsa de Rathke e hipoplasia do lobo anterior da hipófise no E14.5 (IO et al., 2004;LT et al., 2004;Ward et al., 2005). Ao nascimento, este dimorfismo permanece evidente, mas o tamanho da hipófise total é normal. Na 8ª semana de vida, no entanto, o volume hipofisário do camundongo mutante é cerca de oito vezes menor que o do selvagem (RD et al., 2006;Ward et al., 2005). O *Pou1f1* (Pit1) não é ativado, e a linhagem *Pit1* não consegue se diferenciar. Isto leva a ausência na expansão do órgão durante o desenvolvimento pós-natal. A hipoplasia é parcialmente atribuída à intensa apoptose das células luminais estratificadas, possivelmente por causa de vascularização deficiente (RD et al., 2006) (Figura 3).

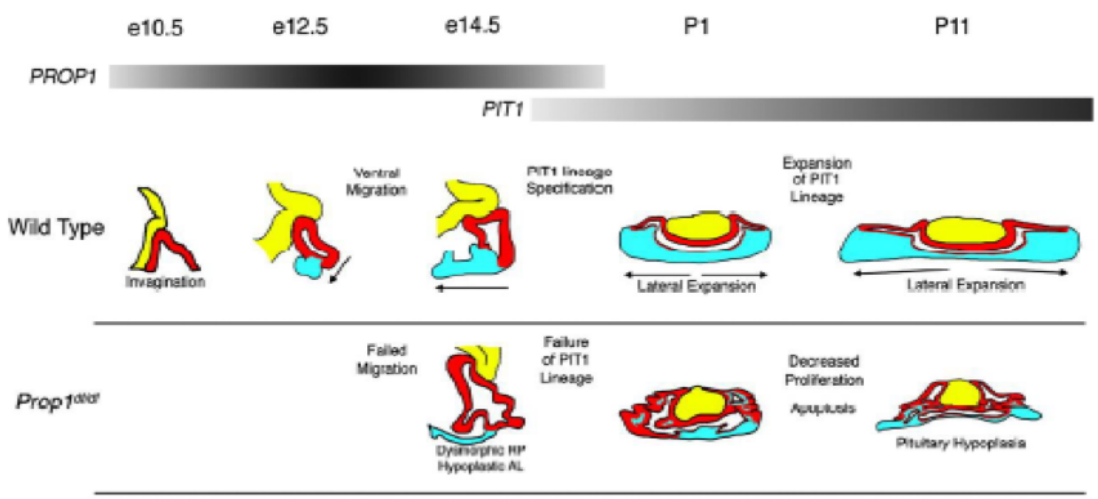

Figura 3: Modelo do desenvolvimento hipofisário em camundongos selvagens e mutantes Ames (Prop1). Retirado de (RD et al., 2006) O perfil de expressão de *Prop1* e *Pou1f1* (*Pit1*) é mostrado como barras pretas acima. Em amarelo, desenvolvimento do lobo posterior, em vermelho, células estratificadas do lúmen, em azul, células do lobo anterior.

1.4 **Maturação sexual e desenvolvimento puberal dos camundongos**

A puberdade em roedores e nos demais mamíferos normalmente é caracterizada pela maturação sexual completa e pelo alcance da capacidade reprodutiva, ocasionando mudanças de nível físico e psicológico. Neste período o sistema reprodutor torna-se capaz de iniciar seus eventos essenciais, como a regulação do ciclo reprodutivo e a ovulação em fêmeas, e o estabelecimento da espermatogênese em machos (CL et al., 2001). Esses fenômenos são controlados principalmente pelo sistema hormonal e nervoso através do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG), e são de caráter essencial para a normalidade do ciclo reprodutivo, permitindo a sintonia de eventos decorrentes da necessidade do organismo (DF et al., 2011).

Foi em 1955 que se começou a formular uma hipótese de que uma porção do hipotálamo era responsável por controlar a função hipofisária através de uma substância humoral (Harris, 1955). Quase 16 anos depois dois laboratórios relataram que essa molécula produzida no hipotálamo e liberada no sistema porta-hipofisário controlava a síntese e secreção das gonodatrofinas, sendo denominada de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (H et al., 1971;M et al., 1971). Com o passar dos anos o GnRH foi descrito como o principal regulador do eixo HPG, sendo que sua liberação se dá de forma pulsátil, agindo diretamente na hipófise para que comece a síntese e liberação das

gonadotrofinas (LH e FSH), que irão ser liberadas na corrente sanguínea e atuarão diretamente nas gônadas (Plant et al.;SB et al., 2018).

Com o intenso estudo do eixo HPG, foi elucidado por volta de 2003 a importância de um outro elemento regulatório envolvido com a biossíntese e secreção do GnRH: o sistema kisspeptina (N et al., 2003;T et al., 2009).

A Kisspeptina e seu receptor, *KISS1R* (antigamente denominado pelo nome do seu gene codificador *GPR54*), foram identificados em 1996 e 1999, respectivamente (DK et al., 1999;JH et al., 1996). Em 2003, dois grupos de pesquisa independentes descobriram que os pacientes com mutação no gene *GPR54*, que tinham como consequência a perda de função do receptor da kisspeptina, apresentavam hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (IHH) (DK et al., 1999;N et al., 2003), e camundongos knockout para os genes *Kiss1* e *Gpr54* demonstraram diversos problemas reprodutivos, como falha ou atraso no desenvolvimento sexual, testículos diminuídos e a interrupção da espermatogênese (N et al., 2003;S et al., 2003;Tassigny et al., 2007).

O papel das kisspeptinas no controle do eixo reprodutivo se dá por neurônios que expressam o gene *Kiss1*, localizados em regiões hipotalâmicas (núcleo anteroventral e periventricular anterior e núcleo arqueado), conseguem perceber alterações dos níveis circulantes de estrógeno e, com isso, ativam a síntese das kisspeptinas, essas serão liberadas nas fendas neuronais ativando diretamente os neurônios GnRH, visto que estes não expressam receptores de estrógeno tipo alfa. Essa dinâmica elucidou que o controle positivo e negativo dos hormônios sexuais no controle da liberação do GnRH se dá através das kisspeptinas, e que esta desempenha um papel de catalisador para o início da

maturação sexual e consequente puberdade (JT et al., 2005;R et al., 2013).

Diversos estudos tanto em humanos, quanto em modelos experimentais demonstraram que diferentes fatores podem interferir diretamente na puberdade, como por exemplo os fatores genéticos, que englobam tanto mutações em genes importantes da regulação reprodutiva quanto mutações em seus receptores ou até mesmo a ação de microRNAs, fatores ambientais, étnicos e nutricionais (AP et al., 2013;MG et al., 2008;SR and A, 2014;SR et al., 2010).

1.4.1 **Caracterização da puberdade e fertilidade no camundongo macho**

A maturação sexual nos camundongos machos evidencia-se fisiologicamente pelo desenvolvimento total da atividade espermática e fenotipicamente pela descida testicular e separação balanoprepucial. A diferenciação dessas células germinativas ocorre continuamente nos túbulos seminíferos localizados nos testículos do animal (SM and HB, 2001). As células espermáticas em diferentes fases são classificadas em quatro categorias: espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides. As células pré-meióticas são chamadas de espermatogônias e incluem desde células tronco regenerativas a células em processo de diferenciação terminal (JF et al., 1990). Com o início da meiose, as células germinativas são chamadas de espermatócitos, e após a meiose, as células haplóides são denominadas espermátides, tendo como produto da diferenciação terminal da espermatogênese, os espermatozoides.

A espermatogênese e esteroidogênese testicular são controladas pelo eixo HPG. Portanto, após a puberdade é necessário que o hormônio GnRH seja liberado e captado pela hipófise estimulando a síntese e liberação de LH e FSH

que atuarão diretamente nas gônadas. O LH irá atuar nas células de Leydig promovendo a síntese e secreção de testosterona, enquanto o FSH exerce um efeito na capacitação das células de Sertoli para que estas comecem a liberar a inibina e ocorra a progressão da espermatogênese (CA and MD, 2010;DD and CY, 2010).

A inibida produzida pelas células de Sertoli, juntamente com a testosterona e o 17- β estradiol, reduzem a secreção de FSH e LH por *feedback* negativo, mantendo assim um controle rigoroso da homeostase do eixo HPG (DD and CY, 2010;S and GF, 2015).

Apesar da importância de ambos os hormônios no processo de espermatogênese e fertilidade, o FSH e seu receptor são dispensáveis a ela. Na ausência do hormônio ou de seu receptor há somente uma redução no número de células germinativas. Em um estudo de 2008, a análise da espermatogênese de camundongos que não expressavam o receptor de FSH mostrou uma redução de 20% no número de células germinativas, possivelmente como resultado da incapacidade de progredir durante a meiose I (MH et al., 2008). Além do papel das gonadotrofinas na capacitação e estimulação de células essenciais para o desenvolvimento da espermatogênese, foi observado através de um camundongo knockout para o receptor androgênico (AR) específico para as células de Sertoli, que a ação da testosterona via AR nestas células é importante para o desenvolvimento espermático, já que esses animais *knockout* apresentam alterações importantes na transição da espermátide redonda para a espermátide alongada (estágio celular mais avançado). Porém, o desenvolvimento dos espermatócitos e a progressão da meiose não foram afetados (K et al., 2014;S and GF, 2015).

Deste modo, parece que o FSH e a testosterona são importantes para a espermatogênese, porém, o início da meiose parece ocorrer de maneira independente a eles.

1.5 **Impacto da reposição hormonal no crescimento e fertilidade.**

Um dos primeiros estudos envolvendo tratamento hormonal na linhagem Ames foi feito em 1965 por Andrzej Bartke (A, 1965). Ele foi pioneiro em demonstrar que camundongos machos com mutação espontânea no gene *Prop1* (*Prop1*$^{-/-}$), que cursavam com deficiência de GH, TSH, PRL, LH/FSH, tinham a fertilidade restaurada após 40 dias de tratamento com GH e levotiroxina. Neste mesmo estudo, um grupo de fêmeas mutadas foi submetido ao tratamento, porém o restauro do eixo HPG não foi observado, condizendo com o quadro de infertilidade. Apesar da diferença encontrada na função reprodutora de machos e fêmeas neste estudo, ambos apresentaram significativo crescimento corporal com o tratamento (A, 1965).

Com o passar dos anos, diversos estudos foram conduzidos usando reposição hormonal neste modelo animal. Dois estudos subsequentes mostraram que em fêmeas de dois modelos de hipopituitarismo congênito (Snell e Ames) houve restauro da fertilidade somente após a hipófise de um animal normal ser transplantada na cápsula renal dos animais deficientes (A, 1971;MJ et al., 1984), corroborando ainda que a PRL placentária é essencial para a manutenção da gestação e início da lactação (A, 1971). Além disso Chandrashekar e Bartke demonstraram que fêmeas ooforectomizadas de dois grupos de camundongos (Ames - *Prop1*$^{-/-}$ e camundongos transgênicos para o gene de GH bovino - bGH) após o tratamento com GH e estrógeno e submetidas posteriormente a estímulo

com gonadotropinas (através de GnRH), tiveram um aumento significantivo dos níveis de LH, ao contrário daquelas que receberam somente o estímulo de gonadotropinas sem tratamento prévio, indicando o efeito potencializador que o bGH tem no GnRH e consequentemente na secreção de LH (V and A, 1996).

Com o passar dos anos, evidências científicas elucidaram o importante papel do GH, não somente no crescimento e no desenvolvimento de mamíferos, mas também em sua função gonadal. Estudos de Childs e colaboradores (GV et al., 1994a;GV et al., 1994b) demonstrou que existe uma relação entre o GH e as células secretoras de gonadotrofinas na hipófise. Antígenos da proteína de ligação do GH foram identificados em células hipofisárias que continham LH e FSH, indicando um possível efeito parácrino do GH no controle da função gonadotrófica (S et al., 1993). Sabe-se que o maior efeito fisiológico do GH se dá via IGF-1, sendo o hormônio do crescimento um estimulador de forma indireta (via STAT-5) na liberação desse fator (EM et al., 2003). Apesar do IGF-1 ser produzido predominantemente no fígado, ele também pode ser sintetizado por tecidos-alvo através da estimulação do GH, atuando de forma parácrina e autócrina e sua produção hepática dependente de GH pode ter como alvo os testículos para a indução da espermatogênese. Também é possível que o IGF-1 seja formado independentemente da ação do GH pelas células de Sertoli e Leydig (Cailleau et al., 1990) e que este fator possa estar relacionado também com o começo do processo de espermatogênese. Estudos *in vitro* revelaram que o IGF-1 aumenta a secreção de gonadotrofinas induzida por GnRH pelas células hipofisárias, sugerindo fortemente que o IGF-1 influência a função neuroendócrina e possivelmente a maturação sexual (JK et al., 1991). Além disso sabe-se que camundongos com nocaute no receptor de GH (GHR-KO)

apresentam atraso de 5 dias na separação balanoprepucial, evento considerado como o principal sinal externo de desenvolvimento puberal em roedores machos (Keene et al., 2002).

Evidências demostram que a ausência da secreção de GH/ IGF-1 em camundongos machos homozigotos da linhagem Ames está relacionada com uma alteração da função hipotálamo-hipófise-gônada. Nesses animais a administração de bGH induziu a secreção de IGF-1 acompanhada por níveis aumentados de LH no plasma e o efeito após administração de GnRH na secreção de LH também foi aumentada neste grupo, porém com níveis menores se comparado aos seus irmãos selvagem. Portanto o pré-tratamento desses camundongos com bGH resultou, não só no aumento da secreção de LH, como também no aumento da produção de androstenediona e testosterona pelos testículos isolados tratados com hCG (gonadotrofina coriónica humana) (V and A, 2003).

Porém, o GH não é o único hormônio a desempenhar um grande papel no desenvolvimento reprodutivo. Sabe-se hoje que o hormônio tireoideano também está relacionado com a função e morfologia testicular. Evidências do seu papel na diminuição da fertilidade e alterações da atividade sexual vem sendo discutidas nas últimas décadas (C et al., 2005;GE and P, 2003). Indivíduos com hipotireoidismo na infância e no período pré-puberal apresentam atraso na maturação sexual e macroorquidia sem virilização, sendo que quanto mais precoce for a falência tireoidiana maior será a gravidade desses aspectos. Contudo, estas alterações podem ser revertidas após reposição hormonal em qualquer período (EA et al., 1995).

Estudos mais recentes demostram que ratos com hipotireoidismo desde o

período pós natal apresentam além de um declínio na capacidade de locomoção dos espermatozoides, anormalidades na maturação das células germinativas no período da espermatogênese (SR and JM, 1988). Além disso, animais com hipotireoidismo congênito secundário a uma mutação no gene da tireoglobulina, tiveram um desenvolvimento testicular completo porém com um atraso significativo em relação aos controles, e suas estruturas testiculares apresentavam um rápido processo de degeneração estrutural, sugerindo que o hormônio tireoidiano parece ser essencial não somente para o desenvolvimento e maturação das células de Sertoli e células germinativas, mas também para a manutenção das estruturas testiculares durante a vida adulta do animal (Y et al., 2004). No modelo Ames, o tratamento exclusivo com levotiroxina no início da vida demonstrou-se eficaz no aumento do peso corporal e no avanço da idade de maturação sexual nos animais *Prop1*$^{-/-}$, porém sem apresentar os efeitos deletérios no metabolismo energético e na homeostase da glicose que o hormônio do crescimento (GH) parece induzir (J et al., 2016). No entanto em 2015 foi publicado um trabalho elucidando que o tratamento combinado de GH e T4 em animais *Prop1*$^{-/-}$ machos parece não apresentar danos deletérios ao metabolismo (A et al., 2015).

Desde 1965 o modelo de hipopituitarismo congênito Ames vem sendo estudado como modelo de infertilidade e longevidade, muitos estudos atribuem o tratamento hormonal como conduta primordial para a maturação sexual e fertilidade dos animais *Prop1*$^{-/-}$ desta linhagem. Porém recentemente foi publicado um artigo com foco no estudo da imunidade intestinal desta linhagem, onde animais homozigotos (*Prop1*$^{-/-}$) sem nenhum tipo de tratamento prévio, porém com atraso na maturação sexual de 3 semanas, relatado apenas por

dados observacionais, foram colocados diretamente para cruzar com seus respectivos pares heterozigotos e resultaram em prole normal, demonstrando uma restauração espontânea do eixo gonadotrófico nesses animais (X et al., 2018). Acredita-se que isto esteja ligado ao fato que esta linhagem foi mudando seu *background* ao longo dos anos conforme acasalamentos heterogênicos (*outbread* ou não aparentado) eram realizados e por consequência uma maior variabilidade genética foi surgindo, sendo capaz, de alguma maneira ainda desconhecida, de restaurar o eixo reprodutivo nesses animais, podendo diferir fenotipicamente dos animais mantidos por cruzamento isogênico (*inbred* ou aparentados).

2. *Justificativa*

Dados em animais com hipopituitarismo congênito sugerem a recuperação do eixo gonadotrófico após tratamento com GH e levotiroxina. Nenhum estudo foi realizado visando a caracterização deste modelo após o restauro assim como a elucidação dos mecanismos moleculares e/ou transcricionais implicados neste processo.

Desta forma, a caracterização do modelo homozigoto para a mutação espontânea no *Prop1* com ou sem tratamento hormonal, mantido por cruzamento isogênico (*inbred)* é de extrema importância para compreender todos os mecanismos envolvidos na restauração do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) após tratamento.

3. Objetivos

Objetivos primários:

- Caracterizar a maturação sexual dos camundongos da linhagem Ames isogênica num período de 90 dias pós natal
- Caracterizar e avaliar a fertilidade em camundongos machos da linhagem Ames mutante após o tratamento hormonal com GH e Levotiroxina.

Objetivos secundários

- Avaliar a fertilidade espontânea do animal Ames mutado mantido por cruzamento isogênico.
- Caracterizar as gônadas dos machos da linhagem Ames mutantes tratados com reposição hormonal comparado aos mutantes Ames não tratados e aos heterozigotos da mesma linhagem.
- Avaliar o espermograma e os transcritos hipofisários dos mesmos animais submetidos a histologia.

4. Material e Métodos

4.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e está registrado com o código 1226/2019.

4.2 Descrição da Linhagem

Foram utilizados camundongos com “background” da linhagem *Prop1 df/*df, Ames. Nestes animais ocorre a troca espontânea de uma timina (T) por citosina (C) na posição 475 do cDNA (ENSMUST00000051159) levando a substituição de uma serina por uma prolina no códon 83.

4.2.1 Manutenção e obtenção dos animais

Os animais foram mantidos de acordo com o protocolo de manutenção de animais experimentais, no Biotério da Faculdade de Medicina da USP sob condições de temperatura e luz controladas (20°C-23°C, ciclo de luz-escuro de 12 h) sendo permitido acesso a ração padrão de purina *ad libitum* e à água.

Os animais foram colocados para acasalamento no próprio biotério e foram obtidos do cruzamento de fêmeas e machos com mutação nos genes *Prop1* em estado de heterozigose. A linhagem Ames com a mutação espontânea no gene *Prop1* mantida na Faculdade de Medicina da USP é isogênica e foi doada pela Prof Sally Camper da Universidade de Michigan, MI, USA.

4.2.2 Genotipagem

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Tony Zangala (Department of Physiology and Biophysics, University of California, Irvine, disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2557115/pdf/jove-6-246.pdf) (Anexo B) e, posteriormente, utilizado para amplificação e genotipagem seguindo o protocolo previamente estabelecido por Dollé e colaboradores (ME et al., 2001) (Anexo C).

4.3 Avaliação da fertilidade espontânea dos animais mutados

Para determinar a fertilidade espontânea dos animais da linhagem Ames isogênica foram realizados acasalamentos entre os animais mutantes com animais heterozigotos sabidamente bons reprodutores por produzirem pelo menos 1 prole nascida viva quando acasalado com fêmea ou macho normal.

Foram utilizados 3 casais de fêmeas mutantes com machos heterozigotos bons reprodutores; 3 casais de machos mutantes que haviam maturado sexualmente com fêmeas heterozigotas boas reprodutoras e 3 casais de animais machos e fêmeas heterozigotos.

Estes casais foram mantidos de acordo com as recomendações de manutenção de animais experimentais citado acima, por um período de 6 semanas. Neste período, os mesmos foram monitorados para avaliação da presença de “plugs” em fêmeas, e posteriormente presença de gravidez e nascimento da prole.

4.4 Amostras

Para a avaliação da maturação sexual e da restauração da fertilidade com o tratamento hormonal foram utilizados animais da linhagem Ames selvagens (controle) e mutados, tratados e não tratados.

Grupo MMTH Machos mutados tratados com levotiroxina e GH **(n=5)**

Grupo MMTS Machos mutados controles tratados com salina **(n=5)**

Grupo MC Machos heterozigotos controle tratados com salina **(n=5)**

Grupo MCWT Machos selvagem **(n=5)**

4.5 Reposição Hormonal

Machos com 30 dias de vida pós-natal foram injetados intraperitonealmente com 2 ug de L-tiroxina (Sigma) 3 vezes por semana e 10 ug de GH recombinante humano 5 vezes por semana (Bergamo), por um período de 40 dias, seguido por injeções de manutenção semanal (na mesma dose) após esses animais serem colocados para acasalamento no intuito de melhorar o crescimento e fertilidade até completar um total de 60 dias de tratamento pós desmame (30 dias pós-natal). Este tratamento já é um protocolo padrão na literatura para este modelo animal (A, 1971;Bartke, 1965;BF et al., 1988;MS et al., 1991).

- Reposição hormonal com o GH: O GH foi diluído em solução salina a 0,9% e pH 7,8 e foi administrado por via intraperitoneal.
- Reposição com levotiroxina: o T4 foi diluído em solução salina a 0,9% e pH 7,8 e foi administrado por via intraperitoneal.
- Os machos mutados controles foram injetados com solução salina a 0,9%

- Os machos heterozigotos controles foram injetados com solução salina a 0,9%.

4.6 Avaliação da Maturidade Sexual dos Camundongos Machos

A avaliação da maturação sexual dos machos mutados (tratados e não tratados) e machos normais (heterozigoto e selvagem) da linhagem Ames *inbred*, foi feita a partir de 21 dias pós natal através da observação da descida dos testículos e da separação balanoprepucial e se estendeu até 90 dias de vida, que foi o período proposto de experimento. O macho foi considerado sexualmente maduro quando estes dois eventos se mostrarem presentes. Assim que a separação foi observada esse macho foi submetido a pesagem em balança digital graduada em g (balança analítica de bancada 9094 Plus – Toledo).

4.7 Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada após aproximadamente os 60 dias de tratamento (90 dias de vida), de acordo com o tempo necessário para que a fêmea viesse a engravidar, e o método utilizado esteve de acordo com os termos propostos pelo CONCEA (MCTI, 2015), onde os animais foram submetidos individualmente, em caixa hermeticamente fechada, a exposição de isofluorano 100% (Isoforine, Cristália, São Paulo, Brasil) embebida em algodão, ocasionando inalação de superdose da substância e consequente óbito, após sedação. Assim que não era mais possível detectar respiração ou batimentos cardíacos, os animais eram pareados por grupo e as medidas antropométricas realizadas.

Após a realização das medidas antropométricas, foi realizada a coleta do epidídimo e das gônadas para espermograma e histologia respectivamente. Por

último, houve a coleta da hipófise, onde os animais foram decapitados para realização da craniectomia látero-superior, que consiste em separar a calota craniana e o afastamento do encéfalo para coleta da glândula hipofisária.

4.8 Dados antropométricos

Avaliação de peso corporal

As medições de peso corporal foram realizadas nos períodos de maturação sexual, início do tratamento (30 dias pós-natal) e no período de eutanásia (aproximadamente 90 dias de vida). O animal foi colocado em cima da balança digital para ter aferido o seu peso em gramas (balança analítica de bancada 9094 Plus – Toledo), e a média dos grupos foi calculada.

Avaliação do peso testicular

Após a eutanásia desses animais, o testículo foi removido através de uma pequena abertura da cavidade abdominal, onde posteriormente, foi feita a limpeza do tecido e pesagem em balança eletrônica graduada em miligramas (balança analítica de bancada 9094 Plus – Toledo), a média dos grupos também foi calculada.

Comprimento naso-anal

No momento da eutanásia os animais foram medidos individualmente com régua convencional graduada em milímetros para determinação do comprimento naso-anal, e foi calculada a média de cada grupo.

4.9 Avaliação da fertilidade

A fertilidade dos machos mutados foi considerada positiva se houve nascimento dos embriões após 21 dias de coito ocorrido do cruzamento de animais mutados tratados com seus pares selvagens.

4.10 Avaliação histológica dos testículos

Após o sacrifício, a cavidade abdominal dos animais foi aberta e os testículos removidos, o excesso de gordura dissecado e uma das gônadas foi fixada por imersão em paraformaldeído 4% por 24 horas. Após a fixação, foi realizada a desidratação gradual em solução crescente de álcool etílico e incluídos em parafina.

A análise gonadal foi feita por cortes seriados de 5 µm de espessura dos blocos de parafina, adotando como referência o eixo horizontal de cada órgão (sentido transversal). Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro e corados pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Os testículos foram categorizados de acordo com o escore de Johnsen, e a classificação de cada animal foi dada pela média da análise de 20 túbulos seminíferos isolados que receberam uma pontuação, de 10 a 1, de acordo com as características descritas na Tabela 1. Cada grupo teve sua pontuação determinada através da média de pontuação individual de cada animal.

Tabela 1: Descrição do Escore de Johnsen (Johnsen, 1970)

Pontuação	Descrição
10	Espermatogênese completa com muitos espermatozoides. Epitélio germinativo organizado, com espessura regular e luz aberta.
9	Muitos espermatozoides. Epitélio germinativo desorganizado, com evidente descolamento ou obliteração do lúmen.
8	Apenas alguns espermatozóides. (<5 – 10)
7	Ausência de espermatozóides e presença de muitas espermátides.
6	Ausência de espermatozóides e presença de algumas espermátides. (<5 – 10)
5	Ausência de espermatozoides e espermátides. Presença de muitos espermatócitos.
4	Ausência de espermatozoides e espermátides. Presença de alguns espermatócitos. (<5)
3	Presença de espermatogônias.
2	Ausência de células germinativas e presença de células de Sertoli.
1	Ausência de células.

4.11 Espermograma

4.11.1 Coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo

Os espermatozoides foram coletados da cauda dos epidídimos dos animais, por meio da imersão da cauda em 1.000 µL de meio de cultura Biggers Whitten Whittingan (BWW), previamente aquecido (37 ºC), em microtubos. Cortes com lâminas estéreis foram realizados no órgão para extravasamento dos espermatozoides. O microtubo foi mantido em estufa a 37 ºC por 15 minutos. A concentração dos espermatozoides foi analisada por meio da utilização de câmara de Neubauer.

Para avaliação da motilidade espermática, uma alíquota da amostra foi depositada sobre lâmina de microscopia (Perfecta, São Paulo, Brasil)., previamente aquecida (37°C) em placa aquecedora, coberta com lamínula também aquecida (37°C) e analisadas em microscopia. Sobre placa aquecida a 37°C, a motilidade foi avaliada em uma escala de 0 a 100%.

4.11.2 Avaliação da vitalidade espermática

Primeiramente, foi dissolvido 0,067g de eosina amarela (CI 45380, MerckKgaA, Darmstadt, Germany), em 10 mL de água destilada, aquecida em banho maria a 72° C, então, foi adicionada 1,0g de nigrosina (CI 50420, MerckKgaA, Darmstadt, Germany). A solução foi resfriada e filtrada em papel filtro qualitativo 80g (Nalgon equipamentos científicos LTDA, 40x40 cm) e armazenada em frasco de vidro âmbar a 4° C.

Para avaliação da vitalidade espermática, foi adicionada uma alíquota de 20 µL de amostra e 20 µL da solução de eosina-nigrosina em um tubo de microcentrífuga, homogeneizadas durante 30 segundos. Dois esfregaços de 20uL foram preparados em lâminas de microscopia (Perfecta, São Paulo, Brasil). Depois de secas, foi contado 200 espermatozoides no microscópio óptico comum, classificados em vivos (não corados) e mortos (corados).

4.12 Avaliação Molecular

4.12.1 Extração de RNA

O RNA mensageiro para análise de expressão gênica foi obtido através da extração de RNA total das hipófises de camundongos isoladamente, separados por grupo. O RNA foi extraído utilizando o método de extração por TriZOL® (Anexo D).

Após a eluição do RNA, o material foi quantificado em aparelho espectrofotômetro (*NanoPhotometer P-300, Implen, Munique, Alemanha*) e determinada a pureza das amostras através da relação A260/280, sendo consideradas para transcrição reversa as amostras com relações maiores que 1,6 e 2,0. A integridade do RNA foi estabelecida por meio da visualização das bandas correspondentes as subunidades de RNA ribossomal: 28S e 18S. Por fim, o material foi estocado a -80ºC.

4.12.2 Transcrição Reversa

O DNA complementar foi sintetizado a partir de 200 nanogramas de RNA total. O cDNA foi obtido através do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo E).

4.12.3 Otimização da concentração de primers

As concentrações ideais de primers para se obter o menor ciclo "threshold" (C_T), minimizando amplificação não específica, foram determinadas através de reações com diferentes concentrações de um "mix" dos primers senso e reverso: 500nM, 200nM e 100nM.

Após a reação, os resultados foram tabulados e foi determinada, para as demais reações, a concentração ótima de menor C_T e ausência de amplificação inespecífica. As reações foram realizadas em quadriplicata e todos os produtos tiveram sua curva de "melting" analisada.

4.12.4 Curva Padrão

A eficiência de amplificação da qPCR foi determinada através da curva padrão com cinco diluições seriadas partindo de 25ng de RNA (25ng; 12,5ng; 6,25ng; 3,1ng) de amostras de animais selvagens. A partir dos dados obtidos, foi gerado um gráfico com os valores dos C_T's versus os fatores de diluição e fez-se uma análise de regressão linear a partir da inclinação da curva (R^2). A eficiência foi calculada utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Eficiência da PCR} = [10^{(-1/\text{inclinação da curva})} - 1] \times 100$$

Foram consideradas ideais as reações com eficiência entre 90% a 110%, e com resultados de R^2 próximos a um.

4.12.5 PCR em tempo real dos transcritos hormonais

Os cDNAs foram utilizados para análise da expressão gênica utilizando o kit "SYBR™ Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante (Anexo H). Foram analisados genes codificadores de hormônios hipofisários, de fatores de transcrição e genes endógenos (*Gapdh e PPiA*) (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos genes utilizados na análise de expressão

Hormônios Hipofisários		
Gene	**Referência**	**Descrição**
Gh	NM_008117	*Growth hormone*
Lh	NM_008497	*Luteinizing hormone beta subunit*
Fsh	NM_008045	*Follicle stimulanting hormone beta subunit*
Tsh	NM_009432	*Thyroid stimulanting hormone beta subunit*
Prl	NM_001163530	*Prolactin*
Gata2	NM_001355253	*GATA binding protein 2*
PPiA	NM_0089071	*Peptidylprolyl isomerase A*
Gapdh	NM_0012897261	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

As amostras foram amplificadas em um termociclador "AriaMx Real-Time PCR System" (Agilent, Santa Clara, CA, USA) e a expressão dos genes entre os grupos MMTH (macho mutado tratado com hormônio) e MMTS (macho mutado

tratado com salina) foi normalizada utilizando amostras de hipófises dos animais selvagens controles (MC/MCWT) pareados para sexo e idade e o gene endógeno de menor variabilidade. A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de Livak e Schmittgen (KJ and TD, 2001), em que o ΔCT representa a diferença de expressão entre o gene-alvo e o endógeno da mesma amostra e o ΔΔCT corresponde a diferença entre o ΔCT da amostra dos grupos mutantes e o ΔCT do calibrador selvagem. Os valores da expressão gênica representarão o número de vezes em que o gene-alvo estará expresso em relação ao calibrador utilizado. Foi considerada variação acima do valor de erro do método, valores relativos >2,5 ou <0,4. Para melhor representação gráfica, foi feita a conversão dos dados de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para "fold change".

Cada amostra foi reproduzida em triplicata e levando em consideração a curva de eficiência foram usadas concentrações diferentes para dois grupos de genes, sendo que o primeiro teve uma concentração total de amostra de 6ng (genes analisados: *Gh* e *Prl*), e para o segundo grupo foi usada uma concentração total de 12ng por amostra (genes analisados: *Gata2, Lh, Fsh, Tsh*), e todos foram normalizados pelo endógeno na mesma concentração.

4.13 Análise Estatística

As análises foram realizadas pelos testes ANOVA e t de Student utilizando o software "GraphPad Prism" versão 9.1.0. Os resultados foram representados pela média ± desvio-padrão de cada grupo. Foram considerados significativos os valores menores a 5% ($p \leq 0,05$).

5. Resultados

5.1 Avaliação da fertilidade espontânea

A fertilidade dos animais mutantes foi comparada com seus respectivos heterozigotos, e observou-se que os casais compostos por animais mutantes não apresentaram nem “plugs” e nem prole durante as 6 semanas de experimentação. Todos os casais heterozigotos apresentaram neste mesmo período a presença de “plug” vaginal e de prole (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação do número de plugs e média de prole entre os casais totalmente heterozigotos (n=4) e os casais mutantes (n=4).

Casal	N° Plugs	Média n° de prole	DP
Casal 1 **HETxHET**	2	7,5	0,7
Casal 2 **HETxHET**	2	8	1,4
Casal 3 **HETxHET**	1	7	-
Casal 1 **fêmea MUT x HET**	-	-	-
Casal 2 **fêmea MUT x HET**	-	-	-
Casal 3 **fêmea MUT x HET**	-	-	-
Casal 1 **macho MUT x HET**	-	-	-
Casal 2 **macho MUT x HET**	-	-	-
Casal 3 **macho MUT x HET**	-	-	-

5.2 **Reposição Hormonal**

Os animais MMTH apresentaram o restauro da fertilidade após o tratamento com GH e Levotiroxina (T4), tendo o número de prole semelhante aos casais controles (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação do número de prole entre os casais controles e os casais de machos mutantes tratados.

Grupo	N	Média Número de prole	DP	P
Controle	5	7,8	0,83	0,63
Mutante Tratado	5	6,6	1,14	

5.3 **Avaliação da Maturidade Sexual**

Os animais controles selvagens (MCWT) e heterozigoto (MC) não apresentaram diferença no tempo para atingir a maturidade sexual com uma média de 28,5 (± 0,44) dias, enquanto os animais mutantes tratados (MMTH) tiveram um atraso significativo ($p \leq 0,0001$) neste mesmo período, atingindo a maturidade por volta somente dos 49,8 dias (± 4,08) (Gráfico 1).

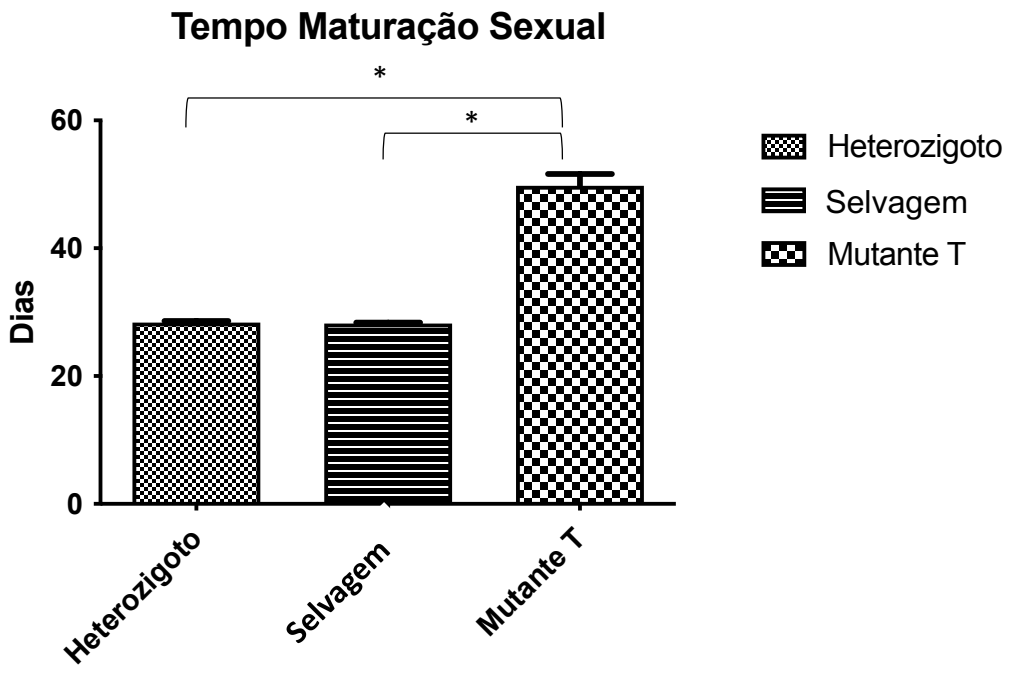

Gráfico 1: Média de dias para atingir a maturidade sexual entre os grupos (n=5/grupo) analisados. NOTA: *p≤0,05.

No grupo dos animais MMTS, somente dois animais apresentaram maturação sexual durante o período analisado de 90 dias, e tiveram uma média de 56,5 (± 3,53) dias para atingir sua maturidade.

O peso dos animais no dia da maturação sexual entre os grupos controle e MMTH não deferiu significativamente (p=0,07), sendo que o primeiro grupo teve uma média de 11,3g (± 0,58), enquanto a do segundo ficou em 10,6g (± 0,54) (Gráfico 2). Os dois animais mutantes do grupo MMTS que maturaram sexualmente apresentaram média de peso em torno de 6g (± 0,14), indicando uma diferença observacional de peso nesses animais em comparação aos outros do grupo, porém devido ao número de amostra não foi possível calcular a estatística.

O tempo de maturação e o peso dos animais neste momento não se diferiram entre os grupos controle MC e MCWT, estes foram considerados como fenótipo semelhantes, optando-se por escolher somente 1 grupo controle para comparação nos próximos experimentos.

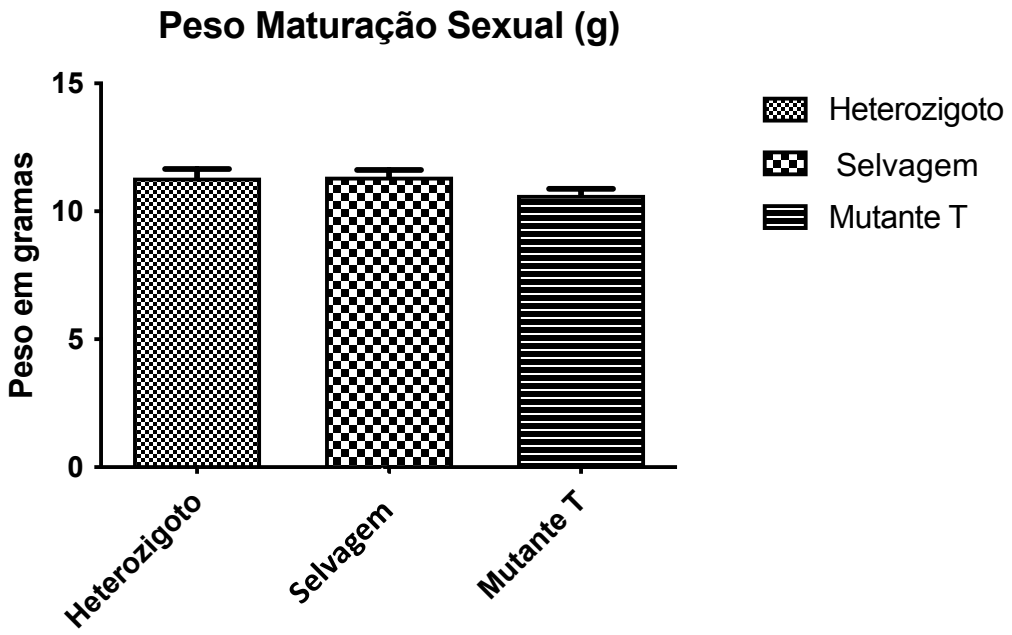

Gráfico 2: Média do peso em gramas nos diferentes grupos (n=5/grupo) analisados no momento da maturação sexual.

5.4 Dados antropométricos

5.4.1 Medicação do peso corporal e comprimento naso-anal

Os animais mutantes de ambos os grupos tiveram seu peso significativamente ($p \leq 0,0001$) menor em 30 dias pós-natal (4,75 ± 0,38) quando comparado aos animais do grupo controle (MC) (12 ± 0,51) (Gráfico 3), ao final do experimento (90 dias pós-natal), o peso e o comprimento naso-anal apresentaram valores significativamente diferente ($p \leq 0,001$) entre todos os grupos, sendo que o grupo controle foi o que apresentou o maior peso (23,77 ± 2,02) e comprimento naso-

anal (17,62 ± 0,50), seguido dos animais mutantes tratados (MMTH) que tiveram um aumento significativo do peso (11,91 ± 1,4) e do comprimento naso-anal (13,73 ± 0,46) em relação ao grupo mutante controle (MMTS), que teve os menores valores de peso (5,11 ± 0,72) e comprimento (9,38 ± 0,22) (Gráfico 4 e Gráfico 5).

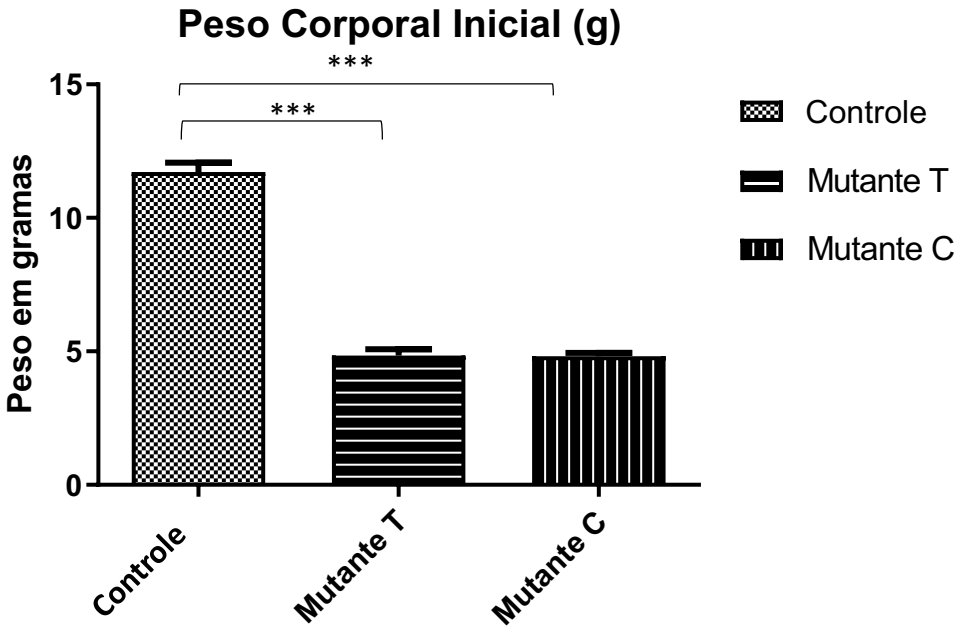

Gráfico 3: Média do peso corporal em gramas entre os grupos (n=5/grupo) no início do experimento (30 dias pós-natal). NOTA: ***p≤0,001.

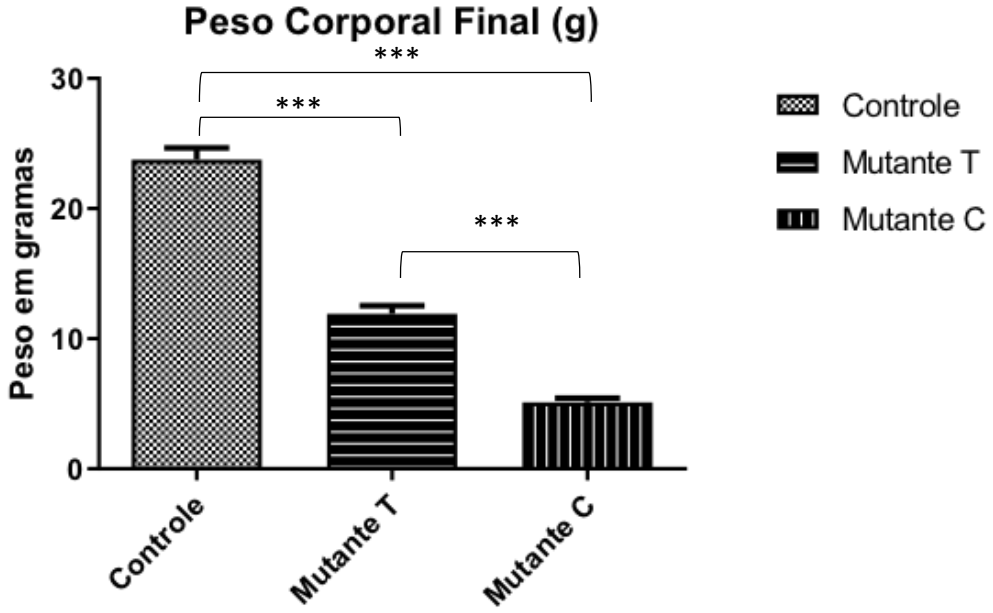

Gráfico 4: Média do peso corporal em gramas entre os grupos (n=5/grupo) no final do experimento (90 dias pós-natal). NOTA: ***p≤0,001.

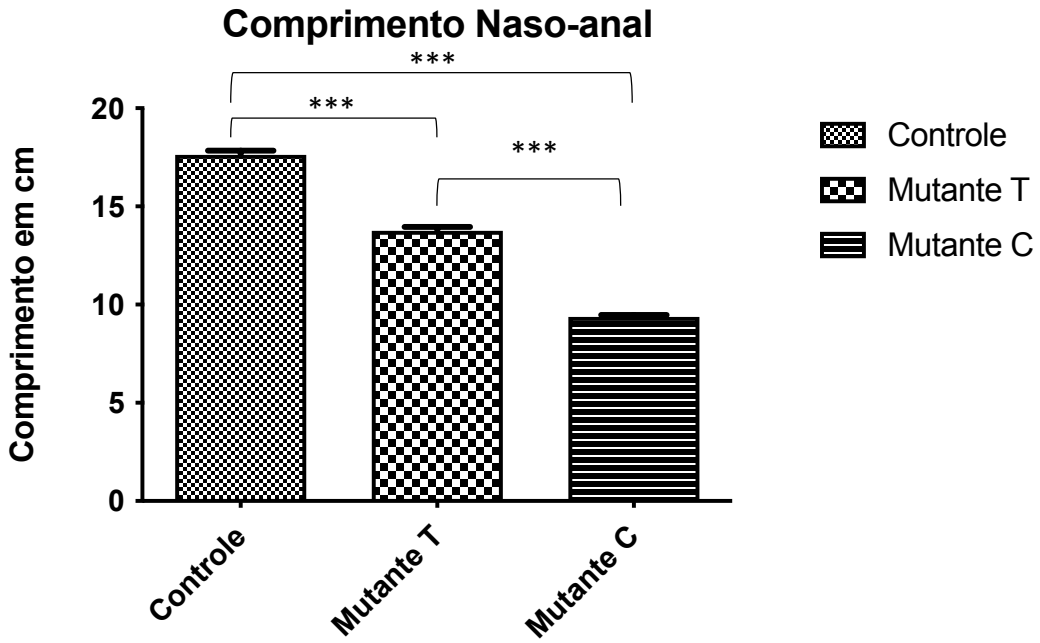

Gráfico 5: Média do comprimento naso-anal em centímetros entre os grupos (n=5/grupo) no final do experimento (90 dias pós-natal). NOTA: ***p≤0,001.

5.4.2 Avaliação do peso testicular

O grupo controle (MC) foi o que obteve uma maior média do peso dos testículos (0,1 ± 0,03), seguido pelo grupo MMTH (0,08 ± 0,015) e pelo grupo MMTS, na qual os testículos apresentaram a menor média de peso (0,016 ± 0,014) (Gráfico 6). Na comparação entre as médias dos grupos, houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo MMTS (p≤ 0,0001), entre o grupo MMTH e o grupo MMTS (p≤ 0,0001) e também entre o grupo controle e o grupo MMTH (p≤ 0,048), porém essa diferença foi menor em relação aos outros grupos acima descritos.

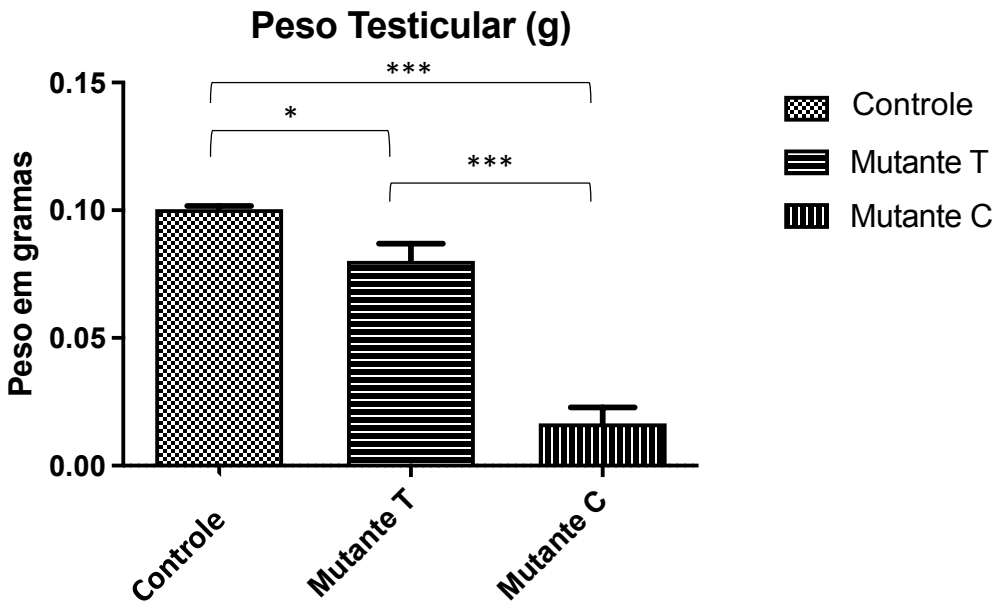

Gráfico 6: Média do peso testicular em grama entre os grupos (n=5/grupo) no final do experimento (90 dias pós-natal). NOTA: *p≤0,05; ***p≤0,001.

5.5. Análise Histológica

Na análise comparativa entre as médias de pontuações do escore de Johnsen, o grupo controle (MC) demonstrou o melhor desempenho (9,7 ± 0,07), seguido do grupo MMTH (8,7 ± 0,19), e tendo como o grupo de pior desempenho o MMTS (5 ± 0,58), com diferença significativa entre o grupo controle e os grupos MMTH ($p \leq 0,02$) e MMTS ($p \leq 0,0001$) e do grupo MMTH com o grupo MMTS ($p \leq 0,0001$) (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação dos valores dos escores de Johnsen entre os grupos.

Grupo	Média Pontuação	DP (Desvio Padrão)
Controle	9,7	0,07
Mutante Tratado	8,7	0,19
Mutante Controle	5	0,58

A análise histológica dos testículos dos animais controles (MC) mostrou espermatogênese completa com um epitélio germinativo espesso e organizado, presença de células de Sertoli e de Leydig com características preservadas e evolução das células germinativas: espermatogônias do tipo A e do tipo B, espermatócitos primários e secundários, espermátides arredondadas e em estágios mais desenvolvidos que se caracterizam pela forma mais alongada e presença de muitos espermatozoides (Figura 4).

O testículo dos animais mutantes tratados (MMTH) também apresentou uma espermatogênese completa com epitélio germinativo organizado e evolução das células germinativas conforme proximidade a luz do túbulo (Figura 5), porém um dos animais apresentou o epitélio germinativo menos espesso e um menor

número de espermatozoides se comparados ao grupo controle (Figura 5C). Em todos os animais do grupo MMTH foi possível identificar células de Sertoli e de Leydig.

Já nos animais mutantes controles (MMTS) observou-se túbulos seminíferos sem luz e com menor diâmetro, além de uma interrupção na espermatogênese nos estágios celulares de espermatócito (em paquíteno), com presença das células de Sertoli, de figuras apoptóticas e túbulos em degeneração com células *Ghost* (indicam necrose coagulativa onde há presença de morte celular, mas retenção da arquitetura da célula). Nesses animais não foi possível o reconhecimento das células de Leydig (Figura 6).

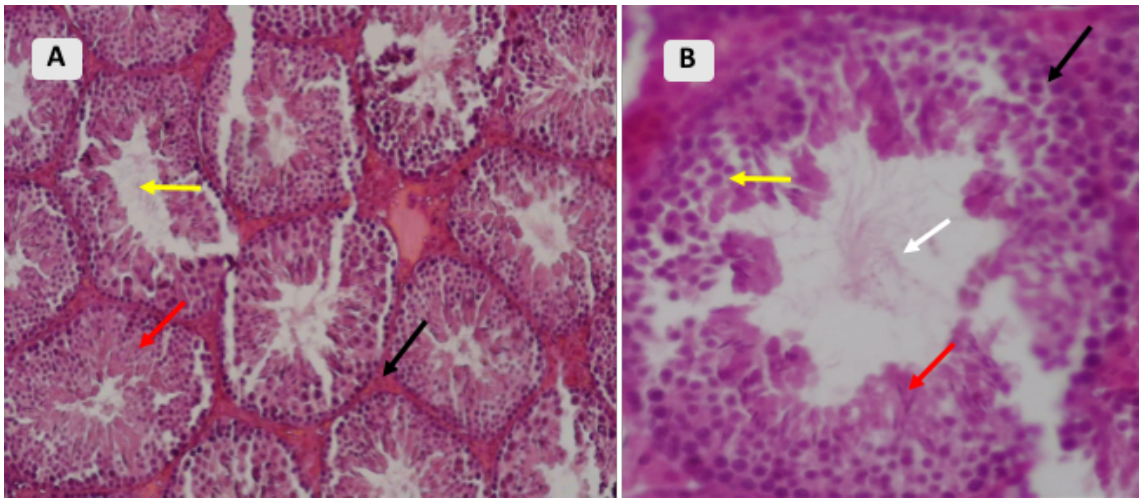

Figura 4: Padrão histológico no macho controle - Em A (aumento de 10x) observam-se as estruturas do testículo: túbulos seminíferos com luz; seta amarela, e epitélio; seta vermelha, bem definidos e a região do interstício; seta preta. Em B (aumento de 20x) observa-se a distribuição das células germinativas em diferentes estágios: espermatogônia; seta preta, espermatócito; seta amarela, espermátide alongada; seta vermelha e espermatozoide; seta branca.

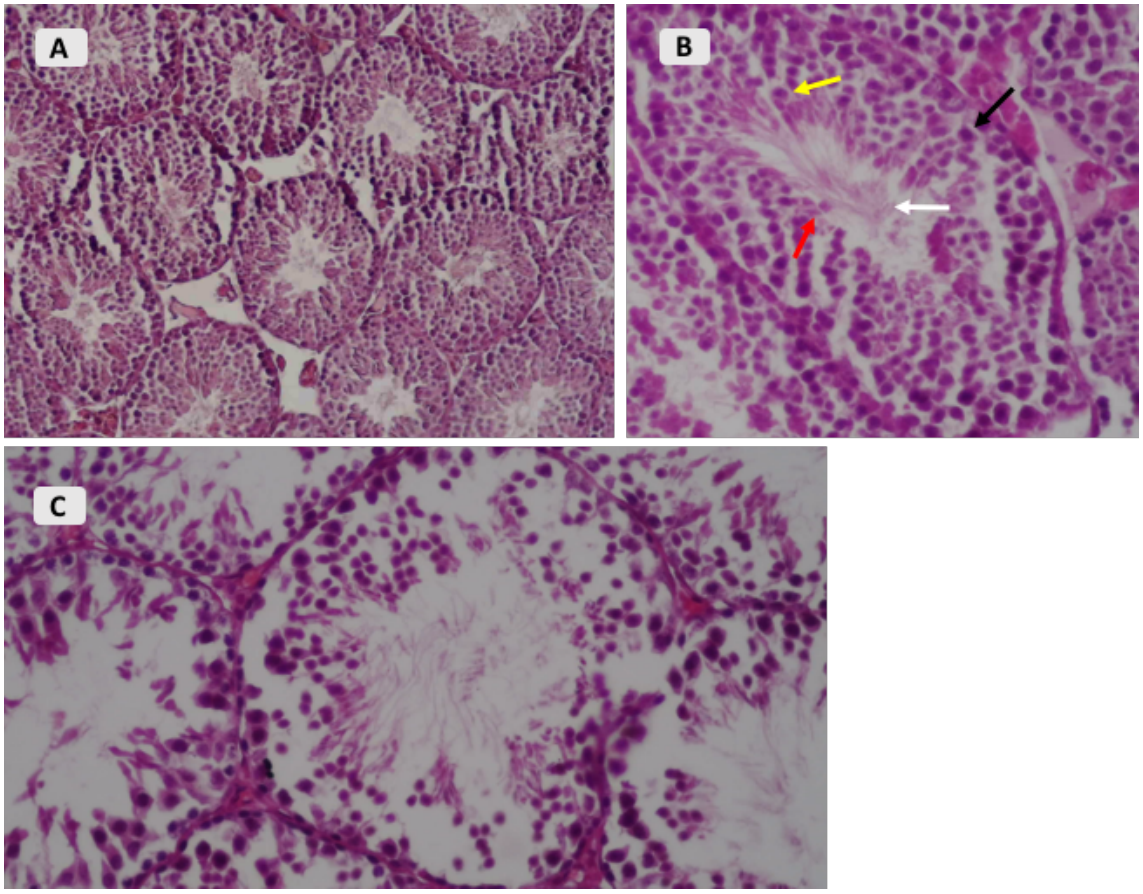

Figura 5: Padrão histológico no macho mutante tratado - Em A (aumento de 10x) observa-se as estruturas do testículo: túbulos seminíferos com luz e epitélio organizados; e a região do interstício. Em B (aumento de 20x) observa-se a distribuição das células germinativas (espermatogônia; seta preta, espermatócito; seta amarela, espermátide alongada; seta vermelha e espermatozoide; seta branca). Em C (aumento de 20x) observa-se os túbulos seminíferos do animal que apresentou o epitélio germinativo menos espesso, porém com espermatogênese completa.

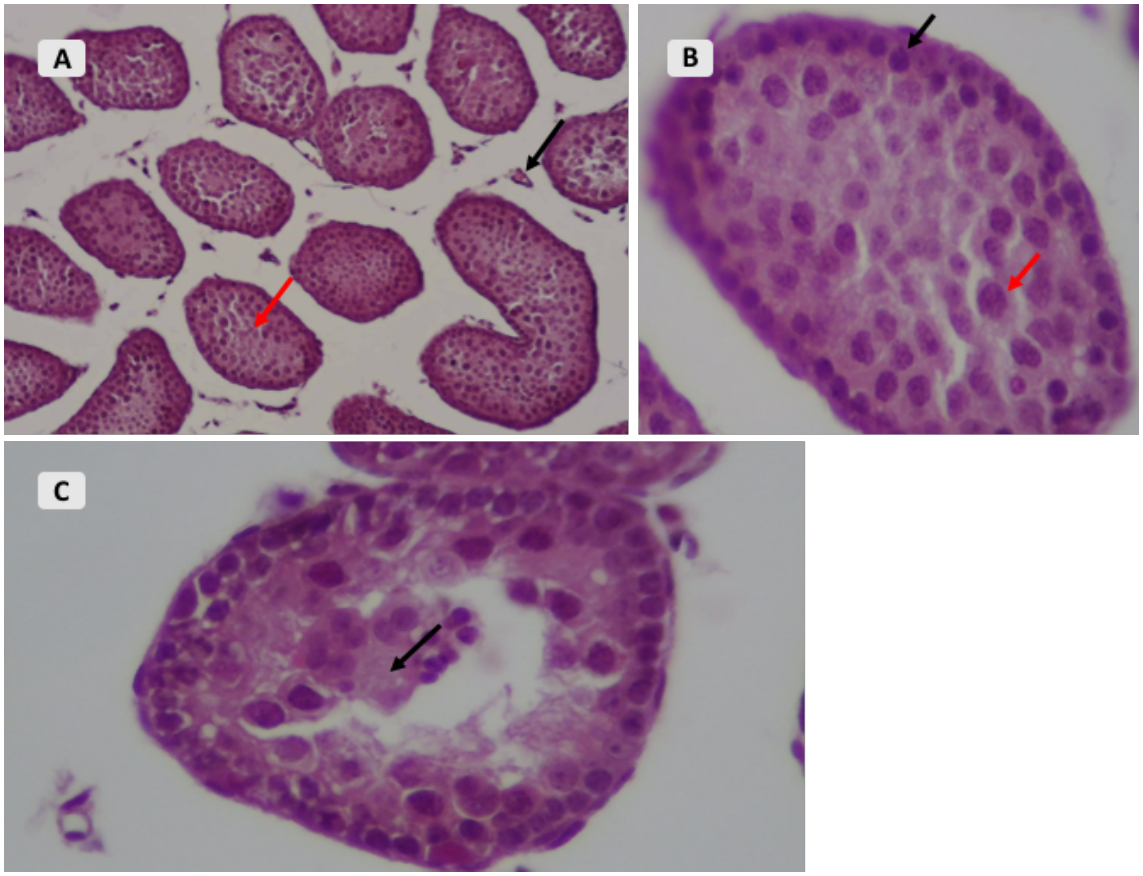

Figura 6: Padrão histológico no macho mutante controle - Em A (aumento de 10x) observa-se as estruturas do testículo: túbulos seminíferos sem luz e com um epitélio menos espesso; seta vermelha; é possível observar a região do interstício, porém devido ao tamanho do tecido e do processamento ele se encontra espaçado; seta preta. Em B (aumento de 40x) observa-se o túbulo seminífero com células germinativas somente até o estágio de espermatócito. A seta preta indica as espermatogônias e a seta vermelha indica os espermatócitos em estágios menos desenvolvidos. Em C (aumento de 40x) observa-se um tubo seminífero em degeneração, com presença de células Ghost; seta preta.

Dentro do grupo dos mutantes controles (MMTS), o mutante que maturou sexualmente teve leves diferenças em sua histologia quando comparado aos demais animais do grupo, podendo agora observar a luz do túbulo seminífero e uma menor presença de figuras apoptóticas e túbulos em degeneração.

Porém a espermatogênese, em sua grande maioria, foi interrompida nos estágios de espermatócito, com alguns túbulos com presença de poucos espermatozoides, porém com epitélio germinativo ainda pouco espesso. Neste animal foi possível reconhecer as células de Leydig (Figura 7).

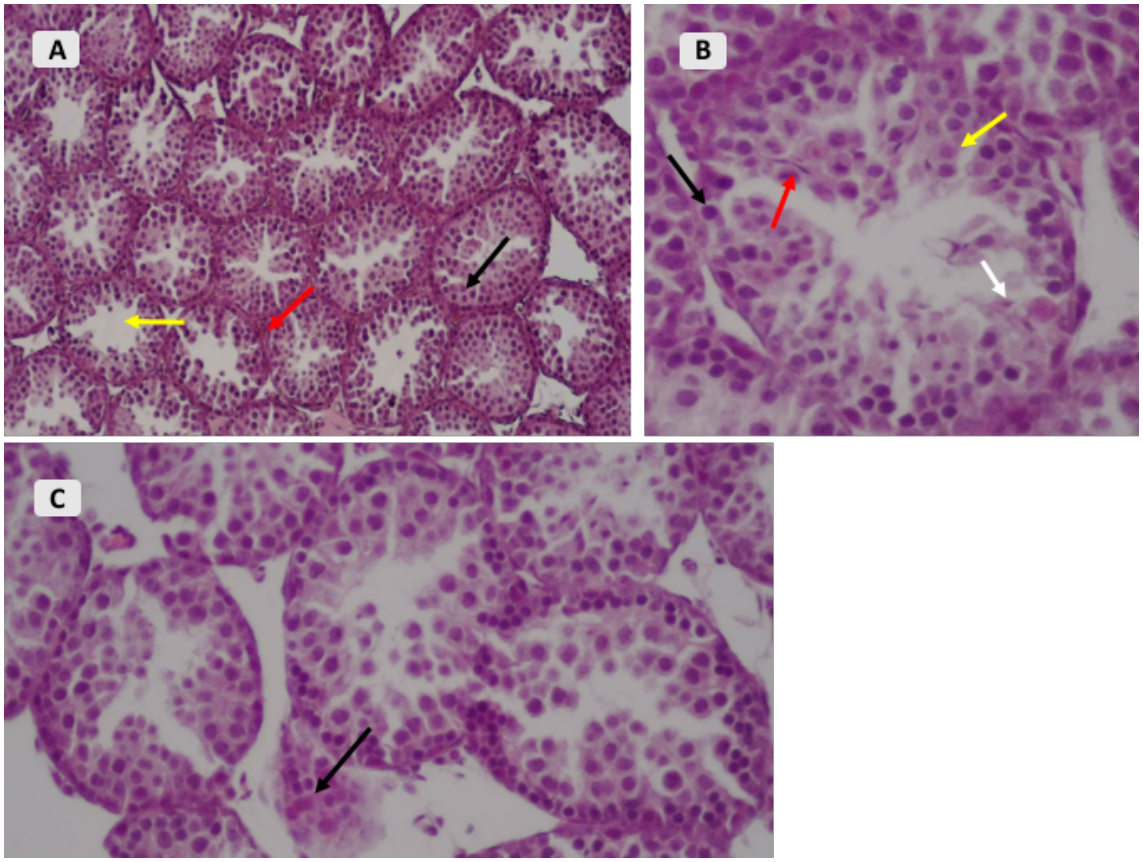

Figura 7: Padrão histológico no macho mutante controle que maturou sexualmente - Em A observa-se as estruturas do testículo (aumento 10x): túbulos seminíferos com luz; seta amarela e um epitélio menos espesso; seta preta; é possível observar a região do interstício agora menos espaçada; seta vermelha. Em B (aumento de 20x) observa-se a distribuição das células germinativas (espermatogônia; seta preta, espermatócito; seta amarela, espermátide alongada; seta vermelha e espermatozoide; seta branca). Em C (aumento de 20x) observa-se as células de Leydig.

5.6. Análise do espermograma

Observa-se que o espermograma entre os grupos dos animais controles MC e dos animais MMTH se assemelha tanto na contagem e concentração total de espermatozoides, quando nos parâmetros de vitalidade e motilidade, sem diferença estatística. No grupo MMTS foi possível observar espermatozoides no espermograma somente de um animal que tinha maturado sexualmente, porem com uma concentração bastante reduzida. O resto do grupo MMTS foi

caracterizado como azoospérmico, devido a ausência de espermatozoides nas lâminas analisadas.

Tabela 6: Dados do espermograma dos grupos analisados

				Vitalidade (%)	
Grupo	**Contagem total de espermatozoides**	**Concentração (milhões/mL)**	**Motilidade (%)**	**Mortos (Corados)**	**Vivos (Não corados)**
Controle (n=5)	81,1	8,11	73	47	53
Mutante Tratado (n=5)	77,2	7,72	80	54,2	45,7
Mutante Controle (n=1)	3,5	0,350	75	61	39

5.6. Análise Molecular

Todos os resultados da análise transcricional são representados pela média dos valores individuais dos animais de cada grupo. Os valores obtidos de ambos os grupos de mutantes foram normalizados com o controle.

Os genes codificadores de GH e PRL não apresentaram expressão relativa nos grupos MMTS ($1,4x10^{-5} \pm 8,6x10^{-6}$; $4,4x10^{-5} \pm 4,3x10^{-5}$, respectivamente) e MMTH (0,007 ± 0,0006; 0,0007 ± 0,0002, respectivamente) em relação ao grupo controle MC (1 ± 0,3; 1 ± 0,21, respectivamente) (Gráfico 7).

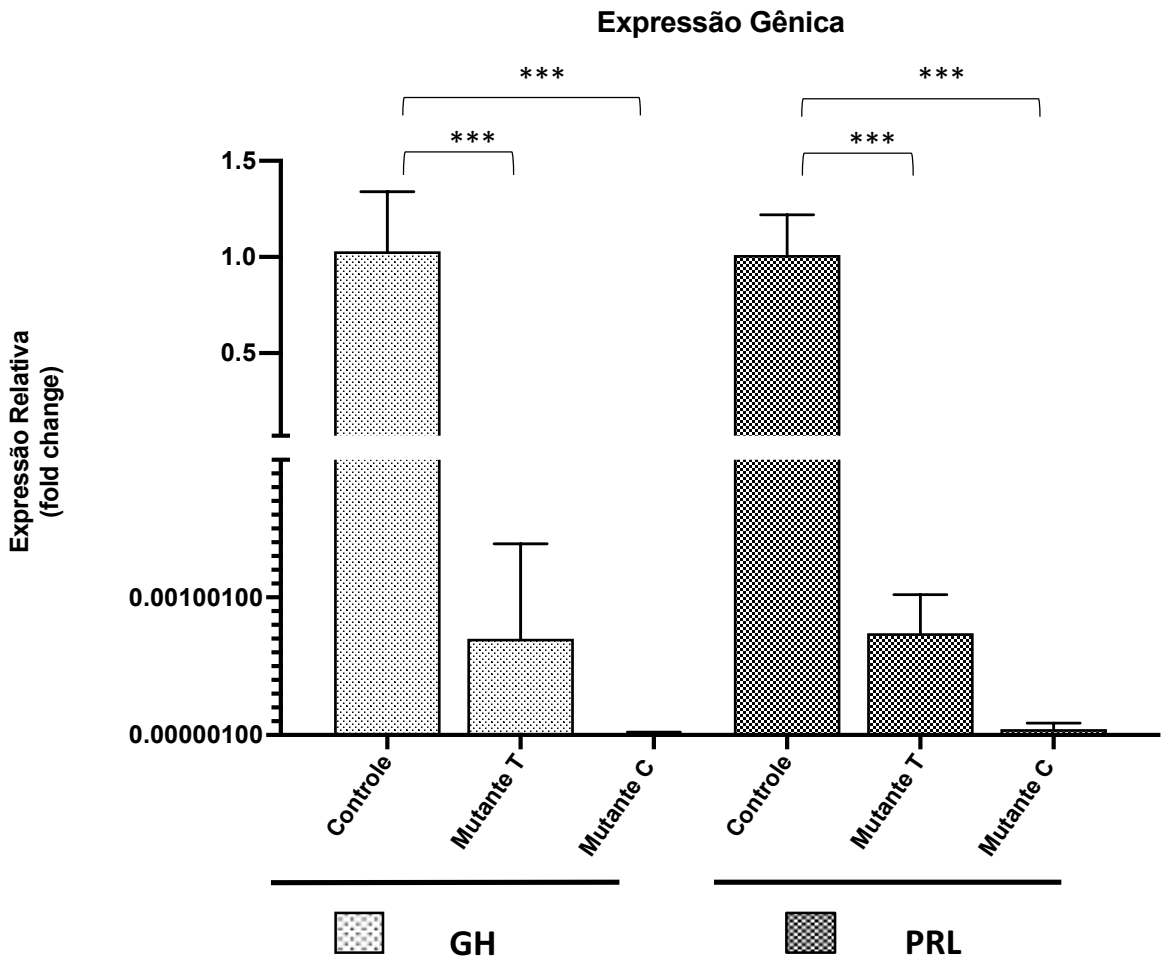

Gráfico 7: Expressão relativa dos genes GH e PRL nos diferentes grupos (n=3/grupo).
NOTA: Os valores estão expressos em "fold change". ***p≤0,001.

A expressão de Lh apresentou diferença estatística (p≤ 0,048) somente nos grupos MMTH e MMTS (1,56 ± 0,68; 0,36 ± 0,34, respectivamente), sendo que o animal do grupo MMTS que maturou sexualmente apresentou um outlier no valor da expressão (0,76) em comparação com os outros dois animais do grupo, que apresentaram os valores de 0,15 e 0,18. A expressão de Fsh foi significativamente maior (p≤ 0,009) entre o grupo controle (1,02 ± 0,2) e o MMTS (0,27 ± 0,03). Embora o grupo MMTH apresentasse um aumento nos valores de expressão de Fsh (0,53 ± 0,22) quando comparado ao MMTS, este não foi estatísticamente significante.

O gene codificador de TSH só se diferiu significativamente (p≤ 0,013) entre o grupo controle (1,06 ± 0,4) e o grupo MMTH (0,05 ± 0,04), porém o animal do grupo MMTS que apresentou a maturidade sexual também apresentou um valor de expressão maior (0,61) quando comparado aos dois outros animais do grupo (0,38 e 0,2). Por outro lado, a expressão do fator de transcrição *Gata2* foi significativamente diferente (p≤ 0,019) somente entre o grupo controle (1 ± 0,15) e o grupo MMTS (0,49 ± 0,19) (Gráfico 8).

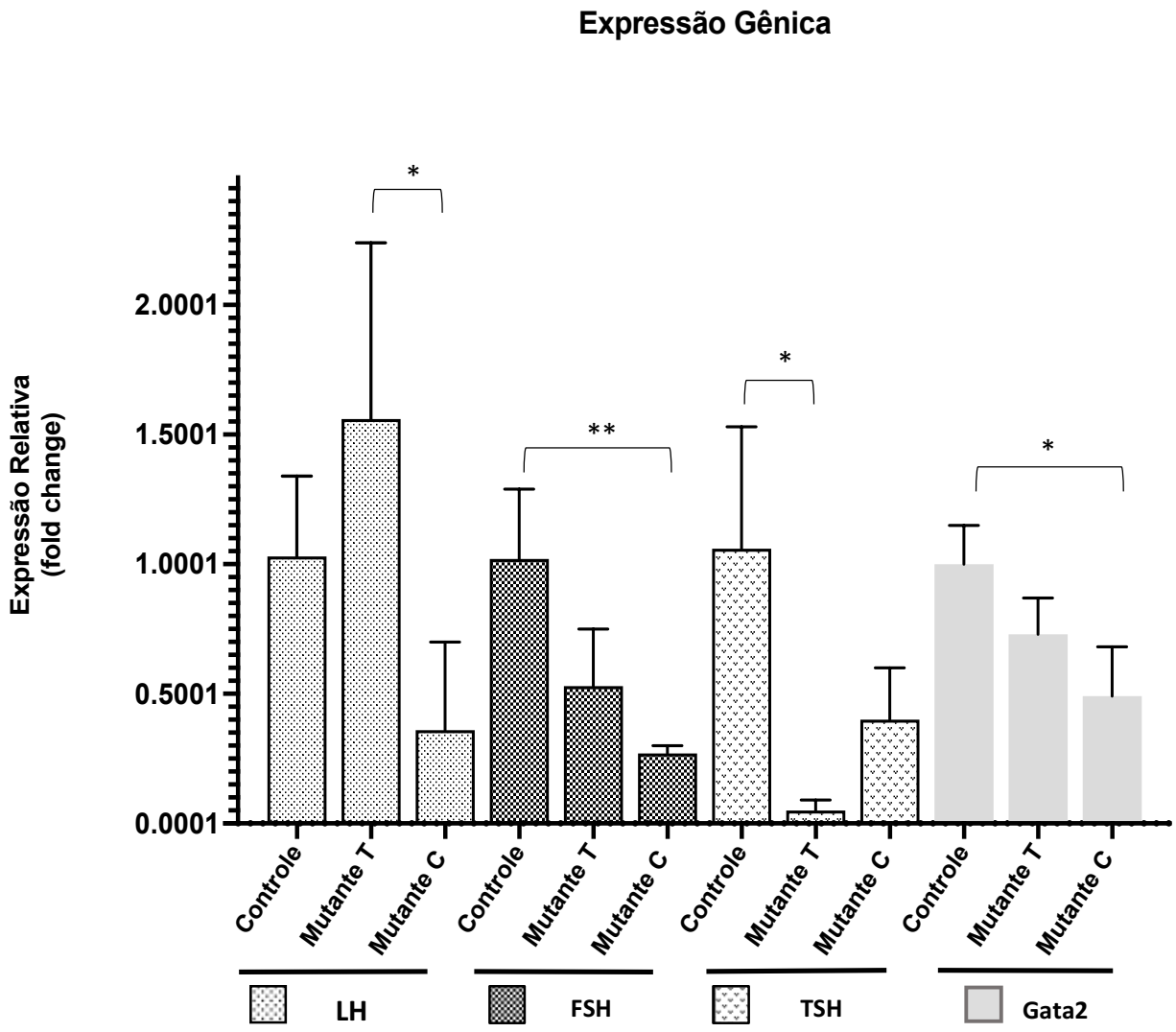

Gráfico 8: Expressão relativa dos genes LH, FSH, TSH e do fator de transcrição Gata2 nos diferentes grupos (n=3/grupo).
NOTA: Os valores estão expressos em "fold change". *p≤0,05; ** p≤0,01.

6. Discussão

Este estudo foi pioneiro em avaliar e caracterizar experimentalmente a maturidade sexual dos machos da linhagem Ames mantida por cruzamento isogênico, demonstrando que os animais homozigotos para a mutação espontânea no gene *Prop1* em geral não maturam sexualmente durante o período analisado de 90 dias. Já o tratamento hormonal com GH e Levotiroxina demonstrou ser eficiente tanto na restauração da maturação sexual adequada quanto na fertilidade desses animais.

A extensa caracterização do sistema reprodutivo dos machos do modelo animal da linhagem Ames isogênica apresentado neste trabalho tem como principal objetivo elucidar em experimentos futuros o papel da reposição hormonal com GH e levotiroxina no modelo mutante do gene *Prop-1* no eixo HPG.

6.1 **Os machos homozigotos da linhagem Ames mantidos por cruzamento isogênico (*inbred*) são inférteis e essa fertilidade é restaurada com o tratamento hormonal a partir de 30 dias pós natal.**

A linhagem Ames, com mutação espontânea no gene *Prop1*, foi descrita em 1965, como um modelo de infertilidade (Bartke, 1965). Ao longo dos anos foram publicados estudos com o objetivo de elucidar e caracterizar este modelo tanto em parâmetros reprodutivos quanto metabólicos. Do ponto de vista do déficit hormonal que estes animais apresentavam, foi demostrado que a deficiência de GH era atribuída como a principal causa na redução da produção hepática e dos níveis circulantes de IGF-1, na diminuição significativa em fase adulta do peso e tamanho corporal, no atraso da puberdade e alterações no metabolismo da glicose (A and H, 2004) e que a deficiência de TSH era mais associada ao

severo quadro de hipotireoidismo e consequente diminuição da temperatura corporal nestes animais (Bartke et al., 2001;WS et al., 1999). A infertilidade desta linhagem foi sendo contestada ao longo dos anos, onde estudos mais recentes publicaram que animais mutantes (*Prop1*$^{-/-}$) eram colocados para acasalar com fêmeas normais, com sucesso, sem tratamento prévio (MM et al., 2009;X et al., 2018), indicando que esses animais apresentavam uma fertilidade espontânea, fato que acreditamos ser atribuído ao cruzamento não aparentado que esta linhagem foi submetida ao longo dos anos, se tornando totalmente heterogênea geneticamente, o que difere dos animais da nossa colônia.

O presente estudo corroborou com o dado de que esta linhagem mantida por cruzamento isogênico (*inbred*) é infértil sem nenhuma intervenção hormonal e que a reposição de GH e levotiroxina por 60 dias parece desempenhar um papel direto na evolução dos parâmetros reprodutivos deste animal com consequente restauro da fertilidade, dados bem descritos na literatura (A, 1971;Bartke, 1965;BF et al., 1988;MJ et al., 1984;MS et al., 1991).

Sabe-se que o tratamento com bGH em machos mutantes da linhagem Ames induz a secreção de IGF-1 acompanhada de um aumento nos níveis plasmáticos de LH (V and A, 1993) via efeito GnRH, com consequente aumento de testosterona, outros modelos animais deficientes ou *knockout* para o GH também demonstram que o IGF-1 está fortemente ligado à função neuroendócrina e que a reposição deste hormônio aumentou a secreção de gonadotrofinas (BR et al., 1999;JK et al., 1991;S et al., 1993), mostrando o papel importante do GH via sinalização IGF-1 no eixo HPG.

Além do papel da reposição hormonal com GH e levotiroxina no restauro da fertilidade, esse tratamento também apresenta uma melhora nos parâmetros

antropométricos nesse modelo, foi possível observar neste trabalho um aumento significativo tanto no peso corporal quanto no comprimento NA dos animais que receberam o GH e levotiroxina, mantendo-os num nível intermediário de peso e tamanho entre seus irmãos normais e seus irmãos mutantes controles sem tratamento. Esse dado é similar a alguns trabalhos na literatura, tendo uma pequena divergência entre esse dado ser de uma recuperação total ou intermediária. Alguns trabalhos, como o de Louis e colaboradores demonstraram o nosso mesmo achado de recuperação parcial do peso e comprimento (A et al., 2010) enquanto outros, como o de Andrew e colaboradores publicado em 2015 demostra que o peso corporal e comprimento dos animais com reposição hormonal, tanto de GH isolado quanto de GH + levotiroxina, se igualou aos seus irmãos normais (A et al., 2015), apesar deste último ter usado uma maior dose de GH e menor dose de T4 em comparação com o nosso estudo, ambos os estudos demonstram que a reposição hormonal tem um efeito significativo no aumento desses parâmetros.

6.2 **A maturidade sexual dos animais mutantes tratados desta linhagem é significativamente atrasada em relação aos seus irmãos controle.**

Outro ponto observado neste trabalho é o atraso na maturidade sexual dos animais de ambos os grupos mutados, com ou sem tratamento (MMTH e MMTS, respectivamente), em comparação aos controles (MC). Todos os animais do grupo MMTS, exceto um, que não receberam nenhum tipo de intervenção hormonal não maturaram sexualmente durante o período analisado (90 dias pós-natal), fazendo-se necessária uma extensão dessa avaliação para experimentos futuros.

Os animais mutantes que receberam o tratamento com GH e levotiroxina (MMTH) apresentaram sua maturação sexual atrasada em 3 semanas, fato já descrito por dados observacionais do Dr. Andrzej Bartke e colaboradores (V et al., 2004). Acreditamos que este atraso na maturação sexual dos animais do grupo MMTH em relação aos seus irmãos normais (MC) seja devido ao começo do tratamento se iniciar após 30 dias pós natal.

Acredita-se também que essa maturação sexual esteja mais relacionada com a reposição hormonal de GH, sendo amplamente sabido o envolvimento deste hormônio no controle desse parâmetro. Diversos estudos demonstram que o GH é capaz de estimular vários aspectos da função gonadal, tanto em animais hipofisectomizados, quanto em animais mutantes com hipopituitarismo, por meio do seu efeito na liberação de GnRH pelo hipotálamo (BR et al., 1999;JK et al., 1991) e de gonadotrofinas pela hipófise (V et al., 2001;V et al., 1999). Em humanos a elevação das concentrações de GH no sangue é encontrada no período de transição de pre-púbere para púbere (SR et al., 1991).

A influência do eixo somatotrófico no eixo HPG aponta para um dos mecanismos que liga a maturação sexual com a nutrição e o crescimento físico, pois a produção de GH e IGF-1 está positivamente relacionada a ingestão de energia, e a maturação sexual parece estar mais relacionada com o peso corporal e crescimento do que com a idade cronológica (Z, 1999;Z, 2002). Nossos achados também demonstram a associação do peso corporal com o período de maturação, já que tanto os animais do grupo MMTH quanto o grupo controle apresentam peso semelhante no momento que atingiram a capacidade reprodutiva.

Outro fator interessante que relaciona o tratamento hormonal com o avanço da capacidade reprodutiva é uma possível ação do sistema kisspeptina no eixo somatotrófico. Achados prévios indicam que este sistema apresenta um papel crucial no controle neuroendócrino da reprodução via regulação do hormônio liberador de gonadotrofinas (LG et al., 2010;MS et al., 2004;R et al., 2013;VM et al., 2004), sendo que algumas evidências recentes sugerem que a kisspeptina também pode apresentar um papel na regulação do hormônio do crescimento. Diversos estudos em modelos animais demostram que a kisspeptina estimula diretamente a secreção de GH e LH pela hipófise, e que esta proteína também pode estar ligada a um aumento na secreção de PRL em algumas espécies (B et al., 2010;BK et al., 2010;E et al., 2007;JP et al., 2012).

Todos esses trabalhos nos sugerem mais uma evidência da ação direta ou indireta do eixo somatotrófico no controle reprodutivo, porém faz-se necessário uma análise mais aprofundada sobre todos os mecanismos subjacentes responsáveis por essa ação.

6.3 **Os animais mutantes tratados apresentaram morfologia e funcionalidade testicular semelhante aos animais controles, enquanto os animais mutantes sem tratamento parecem ter este parâmetro menos desenvolvido.**

Na análise histológica pelo score de Johnsen entre os grupos foi possível notar que houve diferença estatística, sendo o grupo controle (MC) o que apresentou o melhor score com espermatogênese completa e maior abundância de espermatozoides e presença de células de Leydig e Sertoli, seguido do grupo MMTH que também apresentou espermatogênese completa com abundância de

espermatozoides. Apesar de encontrarmos um epitélio menos espesso em um dos animais, ele ainda apresentou bom score com presença de todos os estágios de células germinativas além das células de Leydig e Sertoli.

Além dos grupos MMTH e MC apresentarem a histologia testicular semelhante, eles também obtiveram equivalência no peso testicular e no espermograma, o que confirma nossa teoria de que o tratamento hormonal tem uma ação periférica e acaba restaurando os parâmetros testiculares. Esse restauro periférico devido a reposição hormonal pode se dar através de sinais provenientes dos níveis de andrógenos, de gonadotrofinas e de IGF-1 estimulados por eles.

É bem definido que as gonadotrofinas são responsáveis por uma ativação direta na capacitação gonadal agindo via duas sinalizações endócrinas: a primeira é através da liberação de testosterona via células de Leydig e a segunda através da liberação de inibina pelas células de Sertoli (S and GF, 2015). Durante a puberdade o FSH influência tanto a capacitação das células de Sertoli quanto a atividade mitótica das espermatogônias e o aumento tanto dessas células germinativas quando da diferenciação celular (MM et al., 1988;S and GF, 2015), porém sua ausência não parece ser um fator crucial para infertilidade (MH et al., 2000;TR et al., 1997). Já a ação do LH na espermatogênese se da de maneira indireta via testosterona/receptor androgênico nas células de Leydig (S and GF, 2015).

Outros dois fatores relacionados ao desenvolvimento normal da espermatogênese é o IGF-1 e a testosterona, sendo que o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1, no testículo, é produzido tanto pelas células de Sertoli quando pelas células de Leydig, desempenhando um papel importante na espermatogênese e no controle da função endócrina deste tecido, podendo

regular o ciclo celular e a apoptose de diversas células germinativas. Um estudo recente demonstrou que o IGF-1 aumentou o número de espermátides redondas e alongadas, diminuindo a apoptose das células germinativas e aumentando sua densidade em meio de cultura (BG et al., 1988;J et al., 2017). A testosterona por sua vez vai ter sua ação principalmente via receptor androgênico e é atribuída por diversos anos como o principal componente de iniciação da espermatogênese.

Nossa hipótese é que os animais do grupo MMTH apresentaram todos os parâmetros testiculares semelhantes aos do grupo controle devido ao tratamento agir no aumento da secreção de gonadotrofinas estimulando a produção de andrógenos quanto de IGF-1 testicular.

A maioria dos animais do grupo MMTS apresentaram um baixo score de Johnsen, com espermatogênese interrompida na fase de espermatócito, indicando uma falha no avanço do desenvolvimento celular até o estágio final de espermatozoide, que também foi confirmado pela falta dessas células no espermograma. Nosso achado na falha de desenvolvimento testicular neste grupo era esperado, visando a deficiência de GH e os baixos níveis de gonadotrofinas que apresentam.

Estudos em modelos animais demonstram que roedores parecem reagir de maneira diferencial, aos humanos, a uma deficiência hormonal, e que o LH, o FSH e a testosterona são os principais fatores endócrinos que controlam a função testicular e consequentemente o desenvolvimento normal da espermatogênese.

Camundongos com deleção no gene que codifica a subunidade beta do LH (LHb) apresentam níveis de testosterona sérica e testicular reduzida e a

espermatogênese não é completamente iniciada, sendo que sua falta de sinalização no período pré-pubere foi associada a um prejuízo na descida testicular (FP et al., 2001;P et al., 2007). Outros estudos demonstram que animais com déficit na secreção de LH apresentam número reduzido de células de Leydig e de sua ação via testosterona e seu receptor (PJ et al., 2009;ZM et al., 2004). Sendo que camundongos knockout para o receptor androgênico (ARKO) no período pós-natal são inférteis e quando essa ablação ocorre no período pós púbere o resultado é uma espermatogênese interrompida com ausência de espermatozoides no epidídimo e testículo (KA et al., 2010;RS et al., 2009). A deficiência isolada de FSH parece desempenhar um papel negativo no número de células de Sertoli e espermatozoides, com incapacidade na geração de espermátides na ausência da sinalização androgênica, porém camundongos machos *knockout* tanto para o receptor de FSH (FSHRKO) quanto para o subunidade beta desse hormônio (FSH-bKO) apresentam desenvolvimento sexual normal e são férteis, somente com a diminuição do volume testicular associado a uma diminuição das células de Sertoli e espermatozóides (MH et al., 2000;TR, 2005).

Em conjunto com os achados na falha do desenvolvimento das células germinativas no grupo MMTS, esse grupo parece não apresentar células de Leydig, já que estas não foram visualizadas nas lâminas. Acreditamos que a falta deste tipo celular se deva a uma carência de estímulos de LH, que sabe-se hoje, não ser indispensável para a diferenciação dessas células, mas que apresentam um papel crítico neste processo. Em animais deficientes deste hormônio o número de células de Leydig é reduzido em 10% quando comparado aos seus

irmãos controles e os níveis de andrógenos neste grupo é quase indetectável (PJ and PJ, 2001).

O único animal do grupo MMTS que apresentou a maturação sexual diferiu em níveis observacionais do restante do grupo em relação ao desenvolvimento testicular, sendo que neste animal foi possível notar uma espermatogênese completa em alguns túbulos seminíferos e a presença de células de Leydig, o que nos indica, juntamente com os dados moleculares, que ele apresenta um maior nível de gonadotrofinas circulantes, porém faz-se necessário um estudo mais extenso e quantitativo desses animais, o qual está além do escopo deste trabalho, mas que poderá ser abordado em estudos futuros.

Um último achado a ser comentado neste tópico é a diferença do peso testicular entre os grupos, sendo que o grupo controle apresentou o maior peso, seguido do grupo MMTH e o grupo MMTS que apresentou o menor valor, é possível correlacionar este dado com os achados do espermograma, onde os grupos que apresentaram maiores valores de peso testicular tiveram uma maior concentração de espermatozoides em relação ao único animal do grupo MMTS, isso porque a relação da produção espermática está intimamente ligada ao peso testicular (França et al., 1998). Portanto a massa testicular é um indicador quantitativo da produção de espermatozoides, uma vez que os túbulos seminíferos são o componente mais abundante no testículo.

6.4 **A reposição hormonal também apresentou um impacto nos valores de expressão genica entre os grupos.**

A pesquisa molecular de genes hipofisários nos diferentes grupos analisados apresentou diferença estatística significativa em sua expressão relativa. Os

grupos MMTH e MMTS apresentaram uma baixa expressão de Gh e Prl em relação ao grupo controle, sendo que o grupo MMTS teve um valor de expressão muito próximo a zero. A baixa expressão desses genes no grupo MMTH pode ser atribuída ao tratamento com GH recombinante humano, uma vez que este, em camundongos, se liga tanto nos receptores de GH quando nos receptores de PRL, fazendo a sinalização para que a hipófise diminua a transcrição da linhagem somatotrópica e lactotrófica, respectivamente (V and A, 2003).

O Lh apresentou diferença somente entre o grupo MMTH e MMTS, acreditamos que esse dado seja devido ao efeito do tratamento com GH, em aumentar a transcrição de Lh em camundongos Ames Prop1$^{-/-}$, fato já descrito por Chandrashekar e Andrzej Bartke em alguns trabalhos, em um deles foi demostrado que o tratamento com GH bovino em machos desta linhagem aumentava significativamente a concentração dos níveis de LH no plasma (V and A, 1993), em outro eles demonstraram que fêmeas oforectomizadas após o tratamento com GH e estrógeno e posterior submissão a estimulo com GnRH também tiverem um aumento significativo nos níveis de LH (V and A, 1996). O fato do grupo MMTS não ter apresentado diferença significante nos níveis de expressão deste gene em relação ao grupo controle, pode estar associado com o *outlier* no valor (aumentado) encontrado no animal deste grupo que maturou sexualmente, porém uma análise mais aprofundada sobre o impacto dessa maturação nos valores de expressão do Lh se faz necessária.

Em contrapartida os níveis de FSH se diferiram apenas entre o grupo controle e o grupo MMTS, sendo que o grupo submetido ao tratamento (MMTH) apresentou melhoras significativas no nível de expressão deste gene. Sabe-se que tanto o tratamento com GH quanto com PRL induz um aumento nos níveis de

gonadotrofinas. Na linhagem Ames, um estudo antigo demostrou que machos Prop1$^{-/-}$ tratados com PRL apresentaram um aumento significativo nos níveis de FSH juntamente com aumento na capacidade de produção de testosterona pelos testículos (A, 1965). Como o tratamento hormonal com GH recombinante humano induz tanto a sinalização via receptores de GH quanto receptores de PRL, acredita-se que o aumento de FSH encontrado nesses animais possa estar ligado conjuntamente a essas duas vias.

Os níveis aumentados na expressão relativa de gonadotrofinas no grupo MMTH está diretamente correlacionado com o restauro da fertilidade e melhora de todos os parâmetros reprodutivos que este grupo apresenta, uma vez que a regulação destes eventos acontece majoritariamente via estimulo destes hormônios (PJ, 2014). Esse argumento também condiz com o achado observacional do único animal do grupo MMTS que apresentou a maturidade sexual, onde seus parâmetros testiculares apresentaram uma melhora em relação ao restante do grupo.

Os níveis de expressão de Tsh também variaram somente entre dois grupos, que foi o grupo controle e MMTH, mais uma vez essa diferença é atribuída pela reposição hormonal com a levotiroxina. O grupo MMTS apresentou uma expressão mais baixa deste gene, porém sem diferença significativa, e acredita-se que esse fato seja devido novamente ao outlier no valor de expressão que o animal que maturou sexualmente apresenta.

Nossos achados moleculares corroboram de certo modo com o que já foi descrito na literatura, onde os animais Ames Prop1$^{-/-}$ sem nenhum tipo de intervenção hormonal apresentam deficiência de GH, PRL e TSH, além de gonadotrofinas reduzidas, e que quando submetidos ao tratamento hormonal acabam tendo um

aumento desses hormônios, principalmente da linhagem gonadotrófica (V and A, 1993;V and A, 1996;V and A, 2003).

Outro marcador analisado neste estudo foi o *Gata2*, ele apresentou diferença nos valores de expressão somente entre o grupo MMTS e o grupo controle. Esse marcador apresenta-se de forma mais precoce no desenvolvimento hipofisário, tendo um aumento de expressão nas linhagens celulares intermediárias que darão origem aos tireotrofos e gonadotrofos sendo um dos fatores de importância nessa trajetória terminal (Zhang et al., 2020).

Sabe-se que outros fatores além das células dependentes de *Pou1f1*(*Pit-1)* estão envolvidos na diferenciação terminal dos hormônios hipofisários (S et al., 2020). Na linhagem Ames é possível observar que animais sem intervenção hormonal apresentem níveis circulantes porém reduzidos de gonodotrofinas, e que animais submetidos ao tratamento tendem a ter um aumento desses hormônios, contudo nenhuma avaliação minuciosa dos fatores hipofisários ligados a diferenciação terminal dessas linhagens celulares foi feita neste modelo animal, assim como a correlação desses genes com o aumento na expressão de LH e TSH que os animais que maturam sexualmente parecem desenvolver, fazendo-se necessário maiores estudos para elucidar o mecanismo que estimula essas vias de maneira alternativa a ativação do *Pou1f1 (Pit-1)*.

7. Conclusão

Os resultados obtidos nesse estudo confirmam que:

- Em relação a caracterização da linhagem:
  - A linhagem Ames isogênica se apresentou infértil.
  - A maturação sexual é rara nos animais Prop1$^{-/-}$ sem nenhum tipo de intervenção hormonal, porém quando ocorre parece ter um atraso de três semanas em comparação com seus irmãos controles.
  - Os parâmetros testiculares nos animais mutantes desta linhagem apresenta-se pouco desenvolvido em relação aos animais controles.
- Em relação ao impacto do tratamento com GH e levotiroxina no sistema reprodutivo:
  - O tratamento foi efetivo no restauro da fertilidade de todos os animais do grupo MMTH.
  - O grupo tratado apresentou maturação sexual, porém ainda com um atraso de 2 semanas, o que foi atribuído pelo período de início do tratamento se dar apenas com 30 dias pós natal.
  - Os animais Prop1$^{-/-}$ submetidos ao tratamento apresentaram melhoras significativas nos parâmetros testiculares e reprodutivos em comparação com os animais sem a intervenção de GH e levotiroxina.
  - O tratamento também teve um impacto positivo nos parâmetros de expressão gênica do grupo MMTH quando comparado ao grupo MMTS, porém estudos mais aprofundados e específicos se fazem necessário para entender o verdadeiro impacto da reposição hormonal com GH e levotiroxina, na sinalização e interação celular responsável pela ativação do eixo HPG.

Em suma podemos concluir que O tratamento com GH e T4 restaura os parâmetros reprodutivos periféricos nos camundongos Ames mutados do sexo masculino.

8. Referências Bibliográficas

A B. (1965) The response of two types of dwarf mice to growth hormone, thyrotropin, and thyroxine. General and comparative endocrinology 5. doi: 10.1016/0016-6480(65)90102-4

A B. (1971) The maintenance of gestation and the initiation of lactation in the mouse in the absence of pituitary prolactin. Journal of reproduction and fertility 27. doi: 10.1530/jrf.0.0270121

A B., H B.-B. (2004) Life extension in the dwarf mouse. Current topics in developmental biology 63. doi: 10.1016/S0070-2153(04)63006-7

A D., V M., X Z., A G., DS W., A S., et al. (2015) Thyroxine modifies the effects of growth hormone in Ames dwarf mice. Aging 7. doi: 10.18632/aging.100739

A L., A B., MM M. (2010) Effects of growth hormone and thyroxine replacement therapy on insulin signaling in Ames dwarf mice. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences 65. doi: 10.1093/gerona/glq018

A L.-B., CK B., RG R. (2000) Genetic defects of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 11. doi: 10.1016/s1043-2760(99)00226-x

AL O.-S. (2003) Growth hormone deficiency (GHD) from birth to 2 years of age: diagnostic specifics of GHD during the early phase of life. Hormone research 60. doi: 10.1159/000071219

AP A., A D., DB M., SD N., VN B., JC G., et al. (2013) Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. The New England journal of medicine 368. doi: 10.1056/NEJMoa1302160

B Y., Q J., T C., WK K., AO W. (2010) Goldfish kisspeptin: molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. General and comparative endocrinology 165. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.06.001

Bartke A. (1965) The response of two types of dwarf mice to growth hormone, thyrotropin, and thyroxine. Gen Comp Endocrinol 5:418-426.

Bartke A., Brown-Borg H., Mattison J., Kinney B., Hauck S., Wright C. (2001) Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice. Exp Gerontol 36:21-28.

BF O.H., C B., RH R., ML O.-G., JT C., JD G. (1988) Genetic mapping and analysis of somatostatin expression in Snell dwarf mice. Brain research 464. doi: 10.1016/0169-328x(88)90037-x

BG V., T B., C O., A N., M S., GC B. (1988) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. Fertility and sterility 49. doi: 10.1016/s0015-0282(16)59837-9

BK W., JA D., RR W., HS M., BP S., JL S. (2010) Interaction of kisspeptin and the somatotropic axis. Neuroendocrinology 92. doi: 10.1159/000318049

BR L., SL G., DM H. (1999) The insulin-like growth factor (IGF) system and gonadotropin regulation: actions and interactions. Cytokine & growth factor reviews 10. doi: 10.1016/s1359-6101(99)00013-1

C C., AM I., A G., E C., M M., A L., et al. (2005) Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo- and hyperthyroid patients. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 90. doi: 10.1210/jc.2005-1135

CA H., MD G. (2010) The key role of vitamin A in spermatogenesis. The Journal of clinical investigation 120. doi: 10.1172/JCI41303

Cailleau J., Vermeire S., Verhoeven G. (1990) Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. Mol Cell Endocrinol 69:79-89. doi: 10.1016/0303-7207(90)90091-l

CJ R., S N.-F., S R. (2009) The molecular basis of hypopituitarism. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 20. doi: 10.1016/j.tem.2009.06.005

CL S., HN R., PE C., JE L. (2001) In vivo gonadotropin-releasing hormone secretion in female rats during peripubertal development and on proestrus. Endocrinology 142. doi: 10.1210/endo.142.7.8239

D K., K R., R L.-B., IC R., MT D. (2009) Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. Endocrine reviews 30. doi: 10.1210/er.2009-0008

DD M., CY C. (2010) Tight junctions in the testis: new perspectives. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences 365. doi: 10.1098/rstb.2010.0010

DE W.-C., SA C. (1998) How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? Trends in genetics : TIG 14. doi: 10.1016/s0168-9525(98)01476-0

DF A., DA E., M D., CB R., RS M., MA W. (2011) Age at menarche, menstrual characteristics, and risk of preeclampsia. ISRN obstetrics and gynecology 2011. doi: 10.5402/2011/472083

DK L., T N., GP O.N., R C., Y L., AD H., et al. (1999) Discovery of a receptor related to the galanin receptors. FEBS letters 446. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00009-5

E G.-P., AJ M.-F., L P., M T.-S., MM M., JP C. (2007) Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. Journal of neuroendocrinology 19. doi: 10.1111/j.1365-2826.2007.01558.x

EA J., S U., M D.A. (1995) Thyroid hormone and male gonadal function. Endocrine reviews 16. doi: 10.1210/edrv-16-4-443

EM K., V H., B L., KA W., CK B., J T., et al. (2003) Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. The New England journal of medicine 349. doi: 10.1056/NEJMoa022926

FP Z., M P., J W., I H. (2001) Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. Molecular endocrinology (Baltimore, Md) 15. doi: 10.1210/mend.15.1.0582

França L.R., Parreira G.G., Gates R.J., Russell L.D. (1998) Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. J Androl 19:335-340; discussion 341-332.

GD S. (1929) DWARF, A NEW MENDELIAN RECESSIVE CHARACTER OF THE HOUSE MOUSE. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 15. doi: 10.1073/pnas.15.9.733

GE K., P P. (2003) Thyroid disease and male reproductive function. Journal of endocrinological investigation 26. doi: 10.1007/BF03345187

GV C., G U., BT M. (1994a) Cytochemical detection of gonadotropin-releasing hormone-binding sites on rat pituitary cells with luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and growth hormone antigens during diestrous up-regulation. Endocrinology 134. doi: 10.1210/endo.134.4.8137763

GV C., G U., D R. (1994b) Cells that express luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) beta-subunit messenger ribonucleic acids during the estrous cycle: the major contributors contain LH beta, FSH beta, and/or growth hormone. Endocrinology 134. doi: 10.1210/endo.134.2.8299592

H M., Y B., RM N., A A., AV S. (1971) Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. Biochemical and biophysical research communications 43. doi: 10.1016/s0006-291x(71)80019-0

H V. (2012) Pituitary stem cells drop their mask. Current stem cell research & therapy 7. doi: 10.2174/157488812798483467

Harris G.W. *Neural control of the pituitary gland*. Eward Arnold, London, 1955.

HL B., KR D., AF S., SA C. (1999) Genealogy of the Anterior Pituitary Gland: Tracing a Family Tree. Trends in endocrinology and metabolism: TEM 10. doi: 10.1016/s1043-2760(99)00189-7

HZ S., H W. (1999) Early steps in pituitary organogenesis. Trends in genetics : TIG 15. doi: 10.1016/s0168-9525(99)01742-4

IO N., RD W., LT R., AF S., TL S., PJ G., et al. (2004) Pituitary hypoplasia and respiratory distress syndrome in Prop1 knockout mice. Human molecular genetics 13. doi: 10.1093/hmg/ddh311

J D., Y F., CM H., S M., LY S., A B. (2016) Original Research: Metabolic alterations from early life thyroxine replacement therapy in male Ames dwarf mice are transient. Experimental biology and medicine (Maywood, NJ) 241. doi: 10.1177/1535370216650292

J Y., H Z., J G., M W., D W., X L. (2017) The effects of IGF-1 on mouse spermatogenesis using an organ culture method. Biochemical and biophysical research communications 491. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.125

JF N., K K., LS F., TE J. (1990) Genetic influences on the timing of puberty in mice. Biology of reproduction 42. doi: 10.1095/biolreprod42.4.649

JH L., ME M., DJ H., KK P., JM T., BE W., et al. (1996) KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. Journal of the National Cancer Institute 88. doi: 10.1093/jnci/88.23.1731

JK H., SR O., WL D. (1991) Insulin-like growth factor I: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. Neuroendocrinology 54. doi: 10.1159/000125924

JL M., MY N., M N., AF B., IP B., T F., et al. (2017) Molecular analysis of brazilian patients with combined pituitary hormone deficiency and orthotopic posterior pituitary lobe reveals eight different PROP1 alterations with three novel mutations. Clinical endocrinology 87. doi: 10.1111/cen.13430

Johnsen S.G. (1970) Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1:2-25.

JP C., A M., M W., AO W. (2012) Kisspeptin-1 directly stimulates LH and GH secretion from goldfish pituitary cells in a Ca(2+)-dependent manner. General and comparative endocrinology 179. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.07.028

JS D., MG R. (2001) Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. Annual review of neuroscience 24. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.327

JT S., HM D., EA S., ML G., RE B., SM E., et al. (2005) Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. Endocrinology 146. doi: 10.1210/en.2005-0323

K D.G., G V., PS A., MF W. (2014) Genome-wide identification of AR-regulated genes translated in Sertoli cells in vivo using the RiboTag approach. Molecular endocrinology (Baltimore, Md) 28. doi: 10.1210/me.2013-1391

KA W., U S., DJ H. (2010) Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. Human reproduction update 16. doi: 10.1093/humupd/dmq003

Keene D.E., Suescun M.O., Bostwick M.G., Chandrashekar V., Bartke A., Kopchick J.J. (2002) Puberty is delayed in male growth hormone receptor gene-disrupted mice. J Androl 23:661-668.

KJ L., TD S. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods (San Diego, Calif) 25. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Kronenberg H., Williams R.H. *Williams textbook of endocrinology*. Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2008.

LG S., SD N., AP S.-N., AP A., VN B., MG S., et al. (2010) Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 95. doi: 10.1210/jc.2009-2421

LT R., R W., SA C. (2002) Lhx4 and Prop1 are required for cell survival and expansion of the pituitary primordia. Development (Cambridge, England) 129.

LT R., SA R., S C., SL D., SA C., PQ T. (2004) Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression. Developmental biology 265. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.09.033

M A., R B., R B., W V., R F., R G. (1971) Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. Biochemical and biophysical research communications 44. doi: 10.1016/s0006-291x(71)80179-1

M T., AS G., SM O.C., DP S., JA M., AP M., et al. (1998) Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. Genes & development 12. doi: 10.1101/gad.12.11.1691

M T., MG R. (1996) The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. Current opinion in cell biology 8. doi: 10.1016/s0955-0674(96)80085-8

Madeira J.L., Nishi M.Y., Nakaguma M., Benedetti A.F., Biscotto I.P., Fernandes T., et al. (2017) Molecular analysis of brazilian patients with combined pituitary hormone deficiency and orthotopic posterior pituitary lobe reveals eight different PROP1 alterations with three novel mutations. Clin Endocrinol (Oxf) 87:725-732. doi: 10.1111/cen.13430

ME D., WK S., J V. (2001) Genotyping the Prop-1 mutation in Ames dwarf mice. Mechanisms of ageing and development 122. doi: 10.1016/s0047-6374(01)00282-2

Mendonca B.B., Osorio M.G., Latronico A.C., Estefan V., Lo L.S., Arnhold I.J. (1999) Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP1 gene. J Clin Endocrinol Metab 84:942-945. doi: 10.1210/jcem.84.3.5537

MG R., P B., J D., AS G., C K., C L., et al. (2000) Multistep signaling and transcriptional requirements for pituitary organogenesis in vivo. Recent progress in hormone research 55.

MG T., SD B., VN B., EB T., W K., S X., et al. (2008) A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. The New England journal of medicine 358. doi: 10.1056/NEJMoa073443

MH A., AN W., V W., I H., PG K., HM C. (2000) The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. Endocrinology 141. doi: 10.1210/endo.141.5.7456

MH A., PJ B., HM C., A M., G V., K D.G., et al. (2008) Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. Endocrinology 149. doi: 10.1210/en.2008-0086

MJ S., A B., P C., F T. (1984) Identification of a placental lactogen in pregnant Snell and Ames dwarf mice. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY) 175. doi: 10.3181/00379727-175-41775

MM M., JA P., MS B., LF H., A B. (2009) Insulin sensitivity as a key mediator of growth hormone actions on longevity. The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences 64. doi: 10.1093/gerona/glp024

MM v.A., HJ v.d.K., DG d.R. (1988) Follicle-stimulating hormone stimulates spermatogenesis in the adult monkey. Endocrinology 123. doi: 10.1210/endo-123-3-1449

MS B., RW K., SA C. (1991) Localization of the panhypopituitary dwarf mutation (df) on mouse chromosome 11 in an intersubspecific backcross. Genomics 10. doi: 10.1016/0888-7543(91)90430-m

MS I., GS F., JT S., BV A., SM P., MJ C., et al. (2004) Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. Neuroendocrinology 80. doi: 10.1159/000083140

MW S., W W., JS D., SE F., DJ N., SM O.C., et al. (1996) Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. Nature 384. doi: 10.1038/384327a0

N d.R., E G., JC C., F M., JL C., E M. (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100. doi: 10.1073/pnas.1834399100

N S., KS A., VK C., MT D. (2015) Recent advances in central congenital hypothyroidism. The Journal of endocrinology 227. doi: 10.1530/JOE-15-0341

Nunes M.T. Glândula Hipófise. In *Fisiologia*, M.d.M. Aires, (ed). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2012, Chapter 66, pp. 1019-1044.

Otto A.P., França M.M., Correa F.A., Costalonga E.F., Leite C.C., Mendonca B.B., et al. (2015) Frequent development of combined pituitary hormone deficiency in patients initially diagnosed as isolated growth hormone deficiency: a long term follow-up of patients from a single center. Pituitary 18:561-567. doi: 10.1007/s11102-014-0610-9

P A., S R., T P., FP Z., M P., I H. (2007) Phenotypic characterisation of mice with exaggerated and missing LH/hCG action. Molecular and cellular endocrinology 260-262. doi: 10.1016/j.mce.2005.11.047

PE M. (2000) Transcription factors in pituitary gland development and their clinical impact on phenotype. Hormone research 54. doi: 10.1159/000053243

PJ B., PJ O.S. (2001) Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. Reproduction (Cambridge, England) 122. doi: 10.1530/rep.0.1220227

PJ O.S. (2014) Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. Seminars in cell & developmental biology 29. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.02.010

PJ O.S., ID M., I H., PJ B., MH A. (2009) Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. Molecular and cellular endocrinology 306. doi: 10.1016/j.mce.2008.11.005

Plant T.M., Zeleznik A., Knobil E. Knobil and Neill's physiology of reproduction. pp. 1 online resource (l, 2550, 2532, 2524 pages).

Prince K.L., Walvoord E.C., Rhodes S.J. (2011) The role of homeodomain transcription factors in heritable pituitary disease. Nat Rev Endocrinol 7:727-737. doi: 10.1038/nrendo.2011.119

R F., RM C., J D., DV R., DJ C., JK E., et al. (2013) Shift in Kiss1 cell activity requires estrogen receptor α. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1610-12.2013

RD W., BM S., LT R., SA C. (2006) Cell proliferation and vascularization in mouse models of pituitary hormone deficiency. Molecular endocrinology (Baltimore, Md) 20. doi: 10.1210/me.2005-0409

RD W., LT R., H S., BM S., IO N., SA C. (2005) Role of PROP1 in pituitary gland growth. Molecular endocrinology (Baltimore, Md) 19. doi: 10.1210/me.2004-0341

RS W., S Y., CR T., C C. (2009) Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. Endocrine reviews 30. doi: 10.1210/er.2008-0025

S F., JA H., G V., L M., S A., A G., et al. (2003) The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. Biochemical and biophysical research communications 312. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.066

S H., WR B., H S., EJ S. (1993) Ultrastructural colocalization of growth hormone binding protein and pituitary hormones in adenohypophyseal cells of the rat. Endocrinology 133. doi: 10.1210/endo.133.3.8396011

S R., GF W. (2015) Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. Spermatogenesis 4. doi: 10.1080/21565562.2014.996025

S Z., Y C., X M., J Y., L Y., M Y., et al. (2020) Single-cell transcriptomics identifies divergent developmental lineage trajectories during human pituitary development. Nature communications 11. doi: 10.1038/s41467-020-19012-4

SA C., TL S., RW K., RH R. (1990) The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. Genomics 8. doi: 10.1016/0888-7543(90)90050-5

SB G., AK R., T R.K. (2018) Mouse models for the analysis of gonadotropin secretion and action. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism 32. doi: 10.1016/j.beem.2018.03.006

Schneider H.J., Aimaretti G., Kreitschmann-Andermahr I., Stalla G.K., Ghigo E. (2007) Hypopituitarism. Lancet 369:1461-1470. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60673-4

SM M.-H., HB A. (2001) Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. Biology of reproduction 65. doi: 10.1095/biolreprod65.3.660

Sornson M.W., Wu W., Dasen J.S., Flynn S.E., Norman D.J., O'Connell S.M., et al. (1996) Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. Nature 384:327-333. doi: 10.1038/384327a0

SR O., A L. (2014) Puberty in 2013: Unravelling the mystery of puberty. Nature reviews Endocrinology 10. doi: 10.1038/nrendo.2013.233

SR O., C D., A L., G K., V M., US S., et al. (2010) Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. Molecular and cellular endocrinology 324. doi: 10.1016/j.mce.2009.12.003

SR R., G M., KM B., GA K., MM U., JL R., et al. (1991) Spontaneous growth hormone secretion increases during puberty in normal girls and boys. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 73. doi: 10.1210/jcem-73-2-428

SR W., JM B. (1988) The effect of acute treatment with two goitrogens on plasma thyroid hormones, testosterone and testicular morphology in adult male rats. Comparative biochemistry and physiology A, Comparative physiology 90. doi: 10.1016/0300-9629(88)90218-6

T F., YZ Z., MX C., YJ Z., L F., R D., et al. (2009) Association between sexual precocity and alleles of KISS-1 and GPR54 genes in goats. Animal biotechnology 20. doi: 10.1080/10495390903004493

Tassigny X.d.A.d., Fagg L.A., Dixon J.P.C., Day K., Leitch H.G., Hendrick A.G., et al. (2007) Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. doi: 10.1073/pnas.0704114104

TR K. (2005) What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? Reproduction (Cambridge, England) 130. doi: 10.1530/rep.1.00660

TR K., Y W., N L., MM M. (1997) Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. Nature genetics 15. doi: 10.1038/ng0297-201

V C., A B. (1993) Effects of age and endogenously secreted human growth hormone on the regulation of gonadotropin secretion in female and male transgenic mice expressing the human growth hormone gene. Endocrinology 132. doi: 10.1210/endo.132.4.8462447

V C., A B. (1996) Influence of hypothalamus and ovary on pituitary function in transgenic mice expressing the bovine growth hormone gene and in growth hormone-deficient Ames dwarf mice. Biology of reproduction 54. doi: 10.1095/biolreprod54.5.1002

V C., A B. (2003) The role of insulin-like growth factor-I in neuroendocrine function and the consequent effects on sexual maturation: inferences from animal models. Reproductive biology 3.

V C., A B., CA A., CH T.-M., ML D., LD R., et al. (2001) Testicular endocrine function in GH receptor gene disrupted mice. Endocrinology 142. doi: 10.1210/endo.142.8.8298

V C., A B., KT C., JJ K. (1999) Pituitary and testicular function in growth hormone receptor gene knockout mice. Endocrinology 140. doi: 10.1210/endo.140.3.6557

V C., D Z., A B. (2004) The consequences of altered somatotropic system on reproduction. Biology of reproduction 71. doi: 10.1095/biolreprod.103.027060

VM N., JM C., R F.-F., ML B., J R., JE S.-C., et al. (2004) Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. Endocrinology 145. doi: 10.1210/en.2004-0413

W W., JD C., RW P., JS D., H F., SM O.C., et al. (1998) Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. Nature genetics 18. doi: 10.1038/ng0298-147

Ward R.D., Raetzman L.T., Suh H., Stone B.M., Nasonkin I.O., Camper S.A. (2005) Role of PROP1 in pituitary gland growth. Mol Endocrinol 19:698-710. doi: 10.1210/me.2004-0341

WS H., WB C., A B., MV G., CJ M. (1999) Low body temperature in long-lived Ames dwarf mice at rest and during stress. Physiology & behavior 67. doi: 10.1016/s0031-9384(99)00098-0

X W., J D., C C., J J., A B., D C. (2018) Intestinal immunity in hypopituitary dwarf mice: effects of age. Aging 10. doi: 10.18632/aging.101393

X Z., AS G., MG R. (2007) Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. Physiological reviews 87. doi: 10.1152/physrev.00006.2006

Y S., S Y., S F. (2004) Developmental delay and unstable state of the testes in the rdw rat with congenital hypothyroidism. Development, growth & differentiation 46. doi: 10.1111/j.1440-169x.2004.00748.x

Z L. (1999) The essential role of IGF-I: lessons from the long-term study and treatment of children and adults with Laron syndrome. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 84. doi: 10.1210/jcem.84.12.6255

Z L. (2002) Growth hormone insensitivity (Laron syndrome). Reviews in endocrine & metabolic disorders 3. doi: 10.1023/a:1020905725012

Zhang S., Liu Z., Wu D., Chen L., Xie L. (2020) Single-Cell RNA-Seq Analysis Reveals Microenvironmental Infiltration of Plasma Cells and Hepatocytic Prognostic Markers in HCC With Cirrhosis. Front Oncol 10:596318. doi: 10.3389/fonc.2020.596318

ZM L., S M., P P., X L., ZW Y., ChV R. (2004) Testicular phenotype in luteinizing hormone receptor knockout animals and the effect of testosterone replacement therapy. Biology of reproduction 71. doi: 10.1095/biolreprod.104.031161

9. Anexos

ANEXO A: Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

MEDICINA USP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **"Avaliação da fertilidade em camundongos com mutação espontânea no gene Prop 1 (Ames) após reposição hormonal"** registrada com o **nº 1226/2019**, sob a responsabilidade de **Luciani Renata Silveira de Carvalho** e **Bruna Viscardi Azevedo,** apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 20.02.19.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 28-01-2019 Término: 30-06-2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos trangênicos Prop1 (Ames)
Nº de animais	**57**
Peso/Idade	4 semanas
Sexo	22 machos e 35 fêmeas
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 20 de Fevereiro de 2019

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

ANEXO B: Protocolo de extração de DNA

O protocolo de extração de DNA foi feito utilizando 3mm da cauda dos camundongos.

1. Corte e coloque os pedaços da cauda (3mm) em um eppendorf de 1,5 ml
2. Adicione 150ul de solução STE e 6,25ul de Proteinase K (10mg/ml stock)
3. Incube a 55°C no termobloco (AccuBlock Digital Dry Bath – Labnet International, Inc.) agitando em vortex a cada hora por 2h.
4. Inative a proteinase K a 70°C por 5 minutos
5. Coloque no gelo por mais 5 minutos
6. Centrifugue o DNA da cauda por 10 minutos a toda velocidade.
7. Decante o sobrenadante em um novo tubo contendo 150ul de Isopropanol.
8. Precipite o DNA invertendo o tubo por 10 segundos
9. Centrifugue por mais 5 minutos e remova o sobrenadante
10. Lave o pellet com etanol 70%
11. Centrifugue por mais 5 minutos a toda velocidade
12. Retire o etanol e deixe secando por 5-10 minutos
13. Ressuspenda o DNA em 50ul de água ultra-pura
14. Volte ao termobloco a 55°C por 1 hora para facilitar na dissolução do DNA.

ANEXO C: Protocolo de Genotipagem da Linhagem Ames

O fragmento de 582 pares de base, que inclui a variante Ser83Pro no gene *Prop1* da linhagem Ames, foi amplificado por PCR utilizando os primers e condições a seguir:

Primer Forward – 5' CGCAACAGTGATGTGAGGATGG 3'
Primer Reverse – 5' AAGGCTGGAGTGTCGGTCTTGA 3'

1. Preparo da PCR

Reagente	1 Amostra (µL)	10 Amostras (µL)
10x PCR Buffer	2,5	25
dNTPs	0,5	5
Primer Forward 250nmol	1	10
Primer Reverse 250nmol	1	10
Taq	0,2	2
ddH_20	16,8	168
Volume total	22	220

2. Alíquotar 3 µL de DNA nos tubos de PCR;

3. Adicionar 22 µL do mix de PCR ao tubo;

4. Colocar os tubos no termociclador e ajustar o programa de acordo com as condições a seguir:

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	95ºC	10’
30	95ºC	20’’
	58ºC	30’’
	72ºC	1’
1	72ºC	10’

5. Correr 5 µL do produto de PCR em gel de agarose 1%;

Fragmento esperado: 582 pb

6. Digerir 10 µL do produto de PCR com a enzima *PflM*I (Van91I) de acordo com as condições abaixo:

Reagente	1 Amostra (µL)	10 Amostras (µL)
***PflM*I (Van91I)**	0,1	1
10x Anza Buffer	2	20
ddH2O	7,9	79
Produto de PCR	10	100
Volume total	20	200

7. Incubar em banho-maria a 37ºC por 2 horas;

8. Correr o volume total da reação em gel de agarose 2%.

Fragmentos esperados:

+/+ 582 pb

df/+ 582 pb, 364 pb, 218 pb

df/df 364 pb, 218 pb

ANEXO D: Extração de RNA

1. Adicionar 200ul de Trizol e macerar o tecido com o auxílio de um pistilo, depois da dissolução total e homogênea do tecido adicionar mais 100ul de Trizol limpando o pestle.

2. Homogeneizar com uma seringa e agulha fina para uma melhor dissolução do tecido.

3. Vortexar vigorosamente por 15 segundos e manter em temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. *Spin down* as amostras brevemente.

4. Adicionar 60ul de clorofórmio gelado, homogeneizar com a pipeta e depois por inversão por 15 segundos e manter em TA por 3 minutos.

5. Centrifugar por 15 minutos a 12.000g a 4°C.

6. Transferir a fase aquosa para um novo tubo de 1,5mL.

7. Adicionar 150ul de isopropanol, homogeneizar por inversão, manter em TA por 10 minutos e centrifugar a 12.000g por 10 minutos a 4°C. Retirar o isopropanol tomando cuidado com o pellet.

8. Lavar o pellet com 300ul de Etanol 75%, vortexar e centrifugar a 12.000g por 5 minutos a 4°C. Retirar o etanol tomando cuidado com o pellet.

9. Deixar secando em TA por no máximo 10 minutos.

10. Ressuspender em 15ul de água RNase free pré-aquecida a 40°C, incubando por no máximo 10 minutos em TA para dissolução do pellet.

11. Quantificar no nanodrop

ANEXO E: Síntese de cDNA

Síntese de cDNA

1. Diluir 200 ng de RNA, ajustando o volume final para 25 [Símbolo]L

2. Preparo da transcrição reversa

Reagente	1 Amostra (µL)	10 Amostras (µL)
10x RT *Buffer*	5	50
10x RT *random primers*	5	50
25x dNTP mix (100nm)	2	20
***Multiscribe* RT**	2,5	25
H_2O *nuclease-free*	10,5	105
Volume total	25	250

3. Preparo da transcrição reversa

- Pipetar 25µL de 2x RT *master mix* em cada tubo eppendorf

- Pipetar 25µL da amostra de RNA

- Volume total= 50µL /tubo eppendorf 0,2mL

- Selar e *spin down* os tubos

4. Colocar os tubos no termociclador e ajustar o programa de acordo com as condições a seguir:

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	25ºC	10’
1	37ºC	120’

1	85ºC	5’’
1	4ºC	∞

- Estocar a - 20°C

ANEXO F: Sequências nucleotídicas dos primers utilizados nas reações de qPCR.

Gene	*Primers*
Gh	F: CGCTTCTCGCTGCTGCTCAT
	R: GTCCGAGGTGCCGAACATCA
Lh	F: CAGTCTGCATCACCTTCACC
	R: GCAGTACTCGGACCATGCTA
Fsh	F: TCCCAGACCATGATGAAGTTGA
	R: CAGCTATGGCAGCAGATTGC
Tsh	F: CCGCACCATGTTACTCCTTA
	R: GTTCTGACAGCCTCGTGTAT
Prl	F: GCAGTCACCATGACCATGAA
	R: AGATTGGCAGAGGCTGAACA
PPiA	F: GCCGATGACGAGCCCTTG
	R: TGCCGCCAGTGCCATTATG
Gata2	F: GATGAATGGACAGAACCGGC
	R: TAAGGTGGTGGTTGTCGTCT

ANEXO G: Protocolo de qPCR

1. Preparar o cDNA, diluindo a amostra em 1:10;
2. Diluir os primers para 5 µM;
3. Preparar a placa;

Reagente	1 Amostra (µL)
SYBR ® Green Mix	10
Primers	1
cDNA	1
H_2O *nuclease-free*	8
Volume total	20

4. Colocar a placa no termociclador e ajustar o programa de acordo com as condições a seguir:

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	25ºC	10’
1	37ºC	120’
1	85ºC	5’’
1	4ºC	∞